



## CIENCIAS BIOMÉDICAS

Artículo original de investigación

# Impacto de la implementación del diagnóstico molecular de protozoos intestinales de importancia médica en el Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí

Luis Enrique Jerez Puebla <sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0002-5343-0421>  
Fidel Ángel Núñez Fernández <sup>1,2</sup> <https://orcid.org/0000-0001-8611-441X>  
Jorge Fraga Nodarse <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9061-2550>  
Lucy J. Robertson <sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0001-5186-4421>  
Isabel Martínez Silva <sup>4</sup> <https://orcid.org/0000-0002-0622-8802>  
Lucía Ayllón Valdés <sup>4</sup> <https://orcid.org/0000-0003-3534-5300>  
Norbert Müller <sup>5</sup> <https://orcid.org/0000-0002-7621-3980>  
Lázara Rojas Rivero <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-2298-092X>  
Iredys Cruz Rodríguez <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-9539-190X>  
Lissette Pérez Santos <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-5127-2167>  
Iraís Atencio Millán <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-3863-9259>  
Jorge Pérez Ávila <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-0303-2959>  
Yanet Pintos Saavedra <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-9814-3477>  
Yanet Fresco Sampetro <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-4987-1942>  
Laura Rodríguez Moreno <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-5335-7175>

<sup>1</sup> Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. La Habana, Cuba

<sup>2</sup> Escuela Latinoamericana de Medicina. La Habana, Cuba

<sup>3</sup> Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Ciencias Biológicas. Oslo, Noruega

<sup>4</sup> Hospital Pediátrico Docente William Soler. La Habana, Cuba

<sup>5</sup> Facultad de Veterinaria, Instituto de Parasitología. Universidad de Berna, Suiza

\*Autor para la correspondencia: [ljerezp@ipk.sld.cu](mailto:ljerezp@ipk.sld.cu)

### RESUMEN

**Introducción:** La implementación de las técnicas moleculares en los laboratorios de parasitología médica ha revolucionado el diagnóstico de protozoos intestinales por su elevada sensibilidad y especificidad, si bien las técnicas convencionales continúan siendo la regla de oro en el diagnóstico de estas parasitosis intestinales. **Objetivo:** Detectar mediante métodos moleculares los principales protozoos intestinales de importancia médica. **Métodos:** Se realizaron 4 estudios de corte transversal, 3 de ellos en niños atendidos en el Hospital William Soler con el objetivo de detectar la infección por protozoos intestinales asociados con cuadros diarreicos y otros síntomas gastrointestinales en el periodo 2014-2019, mediante métodos convencionales y moleculares. El cuarto estudio comprendió la confirmación por métodos moleculares de casos esporádicos de ciclosporiasis. Además, se describe un reporte de caso de ciclosporiasis y microsporiasis en un paciente con virus de inmunodeficiencia humana/sida mediante la técnica de reacción en cadena de polimerasa en tiempo real. **Resultados:** En los 2 primeros estudios centrados en la epidemiología de la giardiasis, se constató el predominio del ensamble B de *G. lamblia*, y mediante la técnica de secuenciación se

#### Editor

Lisset González Navarro  
Academia de Ciencias de Cuba.  
La Habana, Cuba

#### Traductor

Darwin A. Arduengo García  
Academia de Ciencias de Cuba.  
La Habana, Cuba

identificaron los subensambles AII y BIV, en los niños sintomáticos estudiados. Se identificó por primera vez mediante reacción en cadena de polimerasa en tiempo real a *Dientamoeba fragilis* en pacientes sintomáticos, además de identificar a la especie *Entamoeba dispar*, dentro del complejo *E. histolytica*/ *E. dispar*. Se demostró la utilidad de la reacción en cadena de polimerasa en el diagnóstico de *Cyclospora cayetanensis* en los casos confirmados mediante la técnica de Zielh Neelsen modificado, y la secuenciación por primera vez de aislamientos de esta coccidia intestinal. La aplicación de la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real intestinales demostró su importancia en pacientes inmunodeprimidos con virus de inmunodeficiencia humana/sida, especialmente para *Cystoisospora belli* y microsporidias. **Conclusiones:** Las técnicas moleculares resultan de invaluable valor para el diagnóstico de varios protozoos intestinales, ya que permite una comprensión más integral de estas infecciones.

**Palabras clave:** protozoos intestinales; diagnóstico; diarrea, PCR. microscopía; Cuba

## Molecular diagnosis of intestinal protozoa of medical importance in the Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí

### ABSTRACT

**Introduction:** The implementation of molecular techniques in medical parasitology laboratories have revolutionized the diagnosis of intestinal protozoa due to their high sensitivity and specificity, although conventional techniques continue to be the gold standard in the diagnosis of these intestinal parasitosis. **Objective:** To detect by molecular methods the main intestinal protozoa of medical importance. **Methods:** They were carried out four cross-sectional studies, three of them in children treated at the William Soler Hospital with the aim of detecting infection by intestinal protozoa associated with diarrhea and other gastrointestinal symptoms in the period 2014-2019, using conventional and molecular methods. The fourth study included confirmation by molecular methods of sporadic cases of cyclosporidiosis. In addition, it is described a case report of cystosporidiosis and microsporidiosis in a Human immunodeficiency virus/Acquired immunodeficiency syndrome patient using the real-time Polymerase chain reaction technique. **Results:** In the first two studies focused on the epidemiology of giardiasis, it was verified the predominance of *G. lamblia* assemblage B, and through the sequencing technique they were identified the AII and BIV subassemblies in the symptomatic children studied. It was identified *Dientamoeba fragilis* for the first time by real-time Polymerase chain reaction in symptomatic patients, in addition to identifying the species *Entamoeba dispar*, within the *E. histolytica*/*E. dispar* complex. It was demonstrated the usefulness of Polymerase chain reaction in the diagnosis of *Cyclospora cayetanensis* in cases confirmed by the modified Zielh Neelsen technique, and the sequencing for the first time of isolates of this intestinal coccidia. The application of intestinal real-time Polymerase chain reaction demonstrated its importance in immunosuppressed patients with Human immunodeficiency virus/Acquired immunodeficiency syndrome, especially for *Cystoisospora belli* and microsporidia. **Conclusions:** Molecular techniques are of invaluable value for the diagnosis of various intestinal protozoa, since they allow a more comprehensive understanding of these infections.

**Keywords:** intestinal parasites; diagnostic; diarrhea; Polymerase chain reaction; microscopy; Cuba

## INTRODUCCIÓN

Las parasitosis intestinales son una de las principales causas de consultas médicas en países en vías de desarrollo

y son una causa importante de morbilidad a nivel mundial. Entre estos, las infecciones por algunos protozoos se consideran que tienen consecuencias significativas para la salud, particu-

larmente en niños. <sup>(1)</sup> Las consecuencias directas suelen ser trastornos gastrointestinales, como diarrea, disentería, dolor abdominal, vómitos y falta de apetito, y los impactos indirectos incluyen efectos sinérgicos negativos sobre el estado nutricional, el retraso en el crecimiento y el desarrollo cognoscitivo. <sup>(2)</sup>

La criptosporidiosis es una de las principales causas de diarrea en niños menores de 5 años a nivel mundial. Igualmente, la giardiosis y las infecciones causadas por *Entamoeba histolytica* se consideran entre las causas más comunes e importantes de diarrea relacionada con parásitos en las poblaciones humanas. <sup>(2)</sup> En población inmunodeprimida las causas parasitarias de la diarrea son más comunes en personas con virus de inmunodeficiencia humana (VIH) no controlado y recuentos bajos de CD4. Los coccidios y los microsporidios intestinales se encuentran entre las posibles causas etiológicas. Además de diarrea pueden causar pérdida de peso y síndrome de desgaste, aumentando así la morbilidad y la mortalidad. <sup>(3)</sup>

Debido a la importancia clínica de las infecciones por protozoos intestinales, la detección rápida y sensible es vital para permitir un tratamiento específico y racional. Tradicionalmente la sospecha clínica inicial se confirma mediante análisis microscópicos que muestran la presencia de protozoos en las heces. Algunas de las desventajas del análisis microscópico clásico han llevado a la búsqueda de nuevos enfoques diagnósticos en la detección de protozoos intestinales. Las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y en el punto de atención parecen mejores métodos para detectar protozoos intestinales. Dada la excelente sensibilidad y especificidad que se logra con los métodos moleculares, la detección del ADN específico del parásito mediante la PCR permite la discriminación entre parásitos morfológicamente indistinguibles que son de diferente clínica y relevancia (como *Entamoeba dispar* y *E. histolytica*). <sup>(4)</sup>

El objetivo del presente estudio es detectar mediante métodos moleculares los principales protozoos intestinales de importancia médica y describir variantes genéticas y análisis de secuencias de algunas de estas especies.

## MÉTODOS

La investigación comprendió 3 estudios descriptivos observacionales y un reporte de caso. Se realizó un estudio descriptivo transversal de enero 2014 a septiembre 2014 en 286 niños remitidos al Hospital Pediátrico Académico William Soler como parte de un programa de vigilancia de infecciones parasitarias intestinales en niños. A todos los casos positivos a *Giardia lamblia* en el examen directo se le realizó la PCR utilizando como diana el gen de la  $\beta$ -giardina. <sup>(5)</sup>

Se realizó un estudio descriptivo transversal en el período comprendido de enero 2015 a marzo de 2016 en 847 niños re-

mitidos al Hospital Pediátrico William Soler con trastornos gastrointestinales y en niños pertenecientes a círculos infantiles y escuelas primarias ubicadas en los municipios de Boyeros, Arroyo Naranjo y La Lisa de la provincia de La Habana, como parte de la pesquisa parasitológica que se realiza cada año por parte del Ministerio de Salud Pública. Los datos epidemiológicos y clínicos de cada niño infectado con *Giardia lamblia* se registraron en cuestionarios. La amplificación por PCR de los casos positivos en la microscopía a *G. lamblia* se llevó a cabo mediante los genes de la tpi y la subunidad menor del ARNr 18S. <sup>(6,7)</sup>

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal entre enero y septiembre de 2019 entre 133 pacientes que acudieron al hospital pediátrico William Soler y al IPK. Los pacientes incluidos en el estudio tenían trastornos gastrointestinales o tenían sospecha clínica de infección parasitaria intestinal. Algunos de los niños incluidos en el estudio participaban en un programa de vigilancia de infecciones parasitarias intestinales. El ADN se extrajo de las 133 muestras de heces utilizando el QIAamp DNA Stool Kit (QIAGEN Inc., Valencia, California, EE. UU.) siguiendo el protocolo del fabricante. Se utilizó un kit de detección multiplex de PCR en tiempo real (qPCR) (VIASURE Kit de detección de *Cryptosporidium*, *Giardia* y *E. histolytica*). <sup>(8)</sup> Para la detección de *Dientamoeba fragilis*, se realizó un ensayo qPCR publicado previamente dirigido a un fragmento de 77 pb del gen ARNr 18S. <sup>(9)</sup>

Se realizó un estudio observacional de enero a diciembre de 2018 en 1247 muestras de heces (de las cuales 148 eran diarreicas), correspondientes a 875 adultos y 372 niños en el Laboratorio Nacional de Referencia de Infecciones Parasitarias Intestinales del IPK. A todas las muestras diarreicas se le realizó la técnica de Zielh-Neelsen modificada y se confirmó el diagnóstico con la implementación de la PCR específica para *Cyclospora cayetanensis* mediante el gen del ARNr 18S, según protocolo descrito. <sup>(10)</sup>

En septiembre de 2020, a un hombre de 44 años con diagnóstico de VIH y sarcoma de Kaposi desde 2006, desarrolló una diarrea crónica no sanguinolenta ([10-12] deposiciones por día). En diciembre de 2020, el paciente fue ingresado en el Centro Nacional de Referencia de Cuba para el Diagnóstico y Tratamiento del SIDA en el Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí para una mayor investigación. El paciente estaba siendo tratado con una terapia antiretroviral (abacavir (300 mg)/lamivudina (150 mg)/zidovudina (300 mg) 2 veces al día. El ADN se extrajo de la muestra de heces mediante el kit comercial QIAamp DNA Stool. Se utilizaron cebadores específicos para amplificar las especies *Cryptosporidium* spp., *Cystoisospora belli*, *Enterocytozoon bieneusi*, y *Encephalitozoon intestinalis*, mediante la técnica de PCE en tiempo real siguiendo protocolos descritos. <sup>(11,12,13,14)</sup>

Los datos obtenidos se almacenaron y tabularon con el paquete de programas Microsoft Excel 2016 y fueron procesados en el paquete estadístico EPINFO versión 6.04. <sup>(15)</sup> Para el análisis de los resultados de la investigación se utilizaron medidas de resumen como porcentajes y tasas de frecuencia y las estimaciones se realizaron con un 95 % de confiabilidad por lo que se consideró la presencia de asociación cuando el valor de  $P < 0,05$  utilizando la prueba X<sup>2</sup>.

## RESULTADOS

En el primer estudio, de las 286 muestras de heces examinadas, 27 fueron positivas a *G. lamblia* después de técnicas de concentración, para una frecuencia de infección de 9,34 %. La mediana de edad entre 27 niños fue de 4,11 años (rango: [1-13] años). No se encontraron patógenos bacterianos en estos casos. Un producto específico de amplificación específico por PCR- $\beta$ -giardina fue obtenido en los 27 casos. La digestión con la enzima de restricción endonucleasa *HaeIII* reveló que el ensamble B de este protozoo intestinal fue el más prevalente (19/27; 70,4 %) que el ensamble A (8/27; 29,6 %). En cuanto a los datos clínicos más comúnmente reportados en los 16 niños sintomáticos, el dolor abdominal fue el indicio más documentado, con una asociación estadística con infección por ensamble B de *G. lamblia*. Con base en los análisis de secuencia del gen de la  $\beta$ -giardina, la PCR productos de niños sintomáticos infectados con ensamblaje A se clasificaron en el subensamble AII.

En el segundo estudio, centrado en la epidemiología molecular de la giardiasis, de 847 niños examinados, un total de 68 (8,0 %) dieron positivo a la infección por *Giardia lamblia* por microscopía. La coinfección con otros parásitos fue encontrada en 11 niños (4 casos con *Entamoeba histolytica/E. dispar*, 2 *Enterobius vermicularis*, 2 *Trichuris trichiura*, 1 *Ascaris lumbricoides*, 1 *Cyclospora cayetanensis*, 1 *Cryptosporidium* spp.).

Los productos de PCR del tamaño esperado fueron amplificados con éxito por el ARNr 18S en 100 % de los casos microscópicamente positivos, y en 63/68 (92,6 %) mediante la PCR-*tpi*. La PCR-*tpi* clasificó 32 (50,8 %) aislamientos como ensamble B y 17 (27,0 %) como ensamble A, mientras que en 14 (22,2 %) casos se identificaron infecciones mixtas (A + B). El ensamble B de *G. lamblia* estuvo significativamente más asociado ( $P < 0,02$ ) con diarrea en los niños estudiados.

Se pudieron secuenciar con éxito 15 amplicones (10 ensambles A y 5 ensamblajes B) correspondientes a niños sintomáticos. Según el análisis filogenético del gen *tpi* (figura 1), los 10 aislamientos del ensamble A se clasificaron como subensamble AII, 4 se identificaron como subensamble BIV y uno como subensamble BIII.

En el tercer estudio de los 133 pacientes, 68 (51 %) eran mujeres y la mediana de edad fue de 25 años (ran-

go de [2 a 78] años). La mayoría de los pacientes (121 de 133; 91 %) residían en área urbana. El síntoma más común informado entre todos los pacientes fue dolor abdominal (41 pacientes; 31 %), seguido de diarrea (31; 23 %), náuseas (18; 14 %) y flatulencia (16; 12 %).

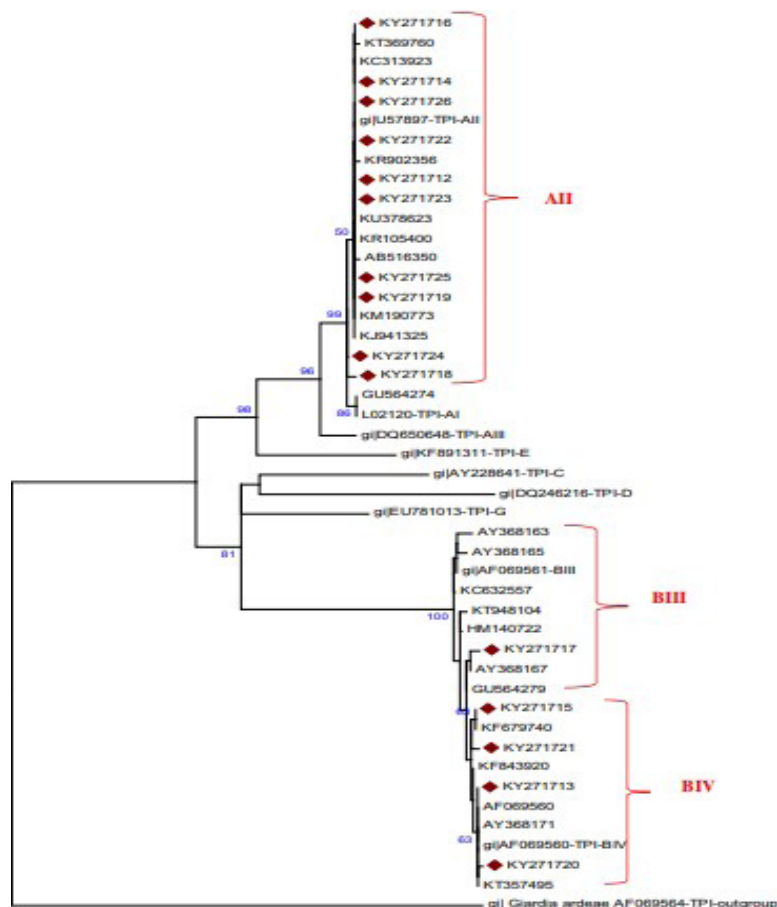
De 133 pacientes se identificó un parásito intestinal de importancia médica por métodos convencionales en 29 niños (22%), siendo *G. lamblia* identificada en mayor frecuencia. De estos, 21 (72 %) fueron infecciones únicas y 8 fueron infecciones mixtas. *G. lamblia* y *Blastocystis* spp. fueron identificados en 5 pacientes. El complejo *E. histolytica/E. dispar* y *Blastocystis* spp., en 2 pacientes, y 1 paciente estaba infectado con *C. cayetanensis* y *Blastocystis* spp.

Se utilizó el kit multiplex en PCR en tiempo real para *G. lamblia*, *Cryptosporidium* spp., y *E. histolytica*. Se identificaron 21 pacientes positivos a *G. lamblia* (los 17 casos que fueron positivos por microscopía y otros 4) y 5 pacientes fueron positivos a *Cryptosporidium* spp. (3 casos que fueron positivos por microscopía y otros 2 por PCR). El índice kappa de Cohen ( $\kappa$ ) para la concordancia entre los métodos de detección utilizados (convencional y molecular) fue de 0,85 (casi perfecto) para *G. lamblia* y 0,74 (acuerdo sustancial) para *Cryptosporidium* spp.

Aunque *Dientamoeba fragilis* no se detectó mediante las técnicas microscópicas, utilizando la PCR en tiempo real se identificaron 16 muestras positivas (figura 2). En 7 de estos pacientes (44 %), no se detectaron otros parásitos intestinales por microscopía o PCR.

En el cuarto estudio se observaron ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en 7 muestras (0,56 % de ocurrencia en el periodo estudiado). No se encontraron otros parásitos de importancia médica en estas muestras. Ninguno de los casos estaba relacionado entre sí, y todos eran inmunocompetentes. Aunque 3 casos fueron niños, también se detectaron adultos infectados por esta coccidia intestinal. Todos los casos con ciclosporiasis fueron diagnosticados en los meses de mayo a junio, lo que sugiere una asociación estacional. Todos los pacientes procedían de La Habana, donde la temperatura media durante el período de diagnóstico fue de 27,3 °C, la humedad de 74 % y los registros de precipitación de 98 mm. La prevalencia de la ciclosporiasis se reporta en otras naciones y a menudo coincide con períodos cálidos de máxima precipitación.

Para las 7 muestras positivas mediante la técnica de Zielh Neelsen se les realizó la extracción de ADN y la amplificación mediante la PCR utilizando como diana el gen que codifica al ARNr 18S. En todas las muestras analizadas se observó el tamaño correcto de la banda. Esto no solo confirma y avala los resultados microscópicos positivos, sino que, además, por primera vez en Cuba, posibilita la implementación de diag-



**Fig. 1.** Árbol filogenético basado en las secuencias del gen *tpi* de los productos de la PCR utilizando un análisis de máxima verosimilitud basado en el modelo de distancia genética método de 2 parámetros de Kimura. La secuencia del gen *Giardia ardae* (AF069564) fue usado como grupo externo

nóstico molecular de la ciclosporiasis. El análisis de varias secuencias obtenidas de este parásito intestinal muestra que presenta una alta homología con secuencias reportadas en el banco de genes (figura 3).

Por otra parte, se investigó la etiología de la diarrea en un paciente en Cuba con VIH. Aunque los diagnósticos moleculares aún no se utilizan de forma amplia en la red de laboratorios del país, los métodos tradicionales fueron complementados en este estudio por el uso de la PCR en tiempo real. Este enfoque permitió la detección de una infección mixta (*Cystoisospora belli* y *Enterocytozoon bieneusi*) (figura 4).

## DISCUSIÓN

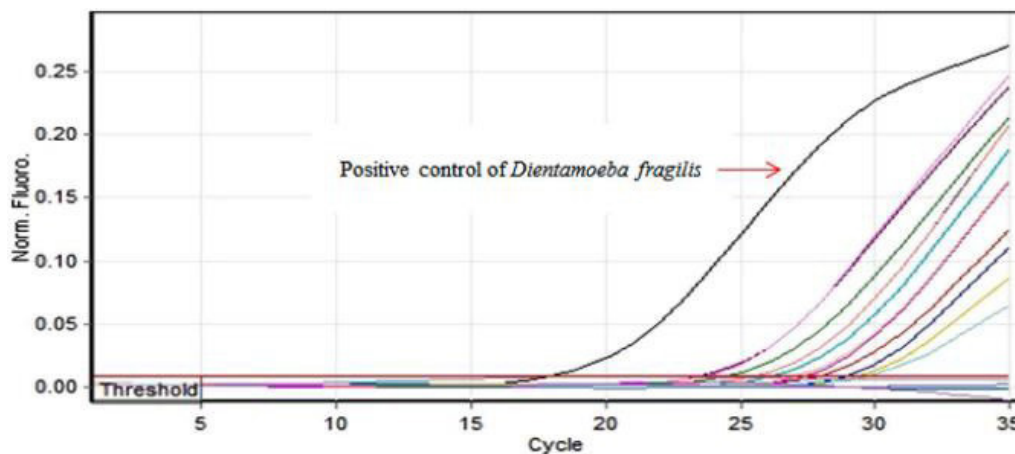
La giardiosis es una infección parasitaria intestinal (IPI) mundial que afecta principalmente a niños en países en vías de desarrollo en todo el mundo. En Cuba la prevalencia de giardiosis en los últimos años ha sido reportada de 6,02 % en población general y en algunos estudios ha alcanzado la cifra de

54,8 % en niños de círculos infantiles lo que confirma que la giardiosis es una de las IPI más importantes en nuestro país. <sup>(16)</sup>

Con base en nuestros resultados se puede postular que si el ensamble B de *G. lamblia* causa una enfermedad más grave, entonces aquellos que están infectados con este grupo genético requerirán asistencia médica con mayor frecuencia; representarán así a la mayoría de casos notificados. Esto puede explicar la mayor prevalencia de infecciones del ensamble B en comparación con las causadas por el ensamble A y B observados en niños sintomáticos de Cuba. No obstante, se necesitan más datos para determinar si intravariaciones en el ensamblaje A están vinculadas a personas que son asintomáticos o muestra un síntoma relativamente leve.

La sintomatología que se desarrolla en la giardiosis probablemente esté determinada por varios factores, entre los que destaca la virulencia del parásito, el estado nutricional e inmunológico del hospedero, la composición y función de la microbiota intestinal y la presencia o ausencia de otros coen-





**Fig. 2.** Detección de *Dientamoeba fragilis* en muestras de heces mediante PCR en tiempo real siguiendo el protocolo de Stark et al., 2006. Control positivo (curva negra) y representación de muestras positivas identificadas

teropatógenos se consideran los más importantes. <sup>(17)</sup> En los últimos años se ha abordado un acercamiento a cómo la genética de la diversidad del parásito puede influir en el resultado, como un posible factor implicado en las diferencias observadas entre niños sintomáticos y asintomáticos. <sup>(18)</sup>

El uso de la epidemiología molecular y en particular las herramientas de subtipificación son importantes para comprender la epidemiología y la transmisión dinámica de la infección por *Giardia*, por ende, contribuye a un mejor conocimiento sobre las características de esta enfermedad parasitaria.

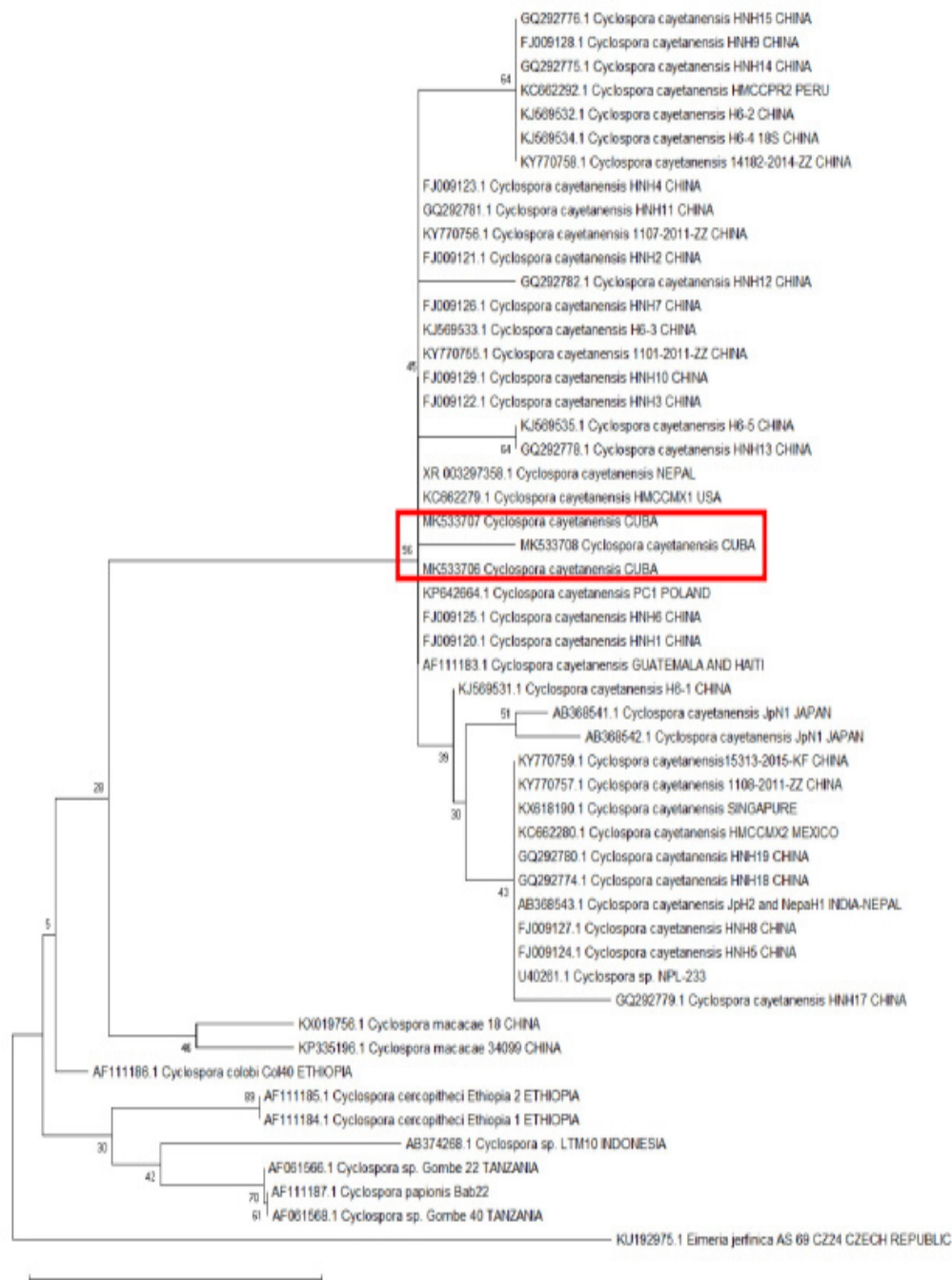
En Cuba, principalmente en niños, se identifica a *G. lamblia* y *Blastocystis* spp., como las especies de protozoos intestinales más frecuentemente identificadas en los estudios epidemiológicos realizados. <sup>(19)</sup> La infección por *D. fragilis* no se había reportado previamente en Cuba, aunque hay informes anecdóticos de la década de 1940, pero esto podría estar asociado con la falta de pruebas diagnósticas sensibles. Es particularmente relevante que el uso de métodos moleculares haya identificado la presencia de *D. fragilis*, lo cual indica que esta infección pudiera ocurrir con relativa frecuencia. Esto sugiere una necesidad de estudios en esta temática, en particular con respecto a la asociación de la infección por este parásito intestinal con el desarrollo de manifestaciones clínicas en el humano.

La sensibilidad y especificidad de la coproscopia para la detección de parásitos protozoarios a veces es deficiente y requiere un trabajo práctico prolongado por un microscopista experimentado, particularmente cuando los niveles de excreción de protozoos intestinales son bajos. Por lo tanto, los ensayos moleculares se utilizan cada vez más

en los laboratorios de diagnóstico, y los paneles multiplex se consideran de particular valor. <sup>(20)</sup>

La ciclosporiosis se reporta ocasionalmente en Cuba, pero se han informado prevalencias de 0,2 % a 4,4 % en niños sintomáticos. <sup>(21)</sup> En pacientes adultos con infección por VIH/sida el rango de prevalencia de esta parasitosis es de 3 % a 3,5 %. Sin embargo, en general los niños son los más comúnmente afectados. <sup>(21)</sup> La ciclosporiosis es endémica en Cuba, pero es reportada con poca frecuencia y parece ser estacional. Aunque las técnicas microscópicas convencionales son muy valiosas en el laboratorio de diagnóstico, particularmente en países como el nuestro, la PCR utilizando el gen que codifica para el ARNr 18S es una buena herramienta para la confirmación de esta infección intestinal y en el estudio de investigaciones de brotes.

La cistoisporiosis causada por *Cystoisospora belli* es una coccidia intestinal de gran importancia médica en pacientes inmunodeprimidos ya que puede inducir el desarrollo de una diarrea crónica potencialmente mortal por deshidratación. <sup>(22)</sup> En pacientes con infección por VIH la cistoisporiosis se considera una enfermedad definitoria del SIDA. El diagnóstico de la infección por *C. belli* generalmente se realiza mediante la identificación de ooquistes característicos en preparaciones húmedas de heces o mediante la tinción de Ziehl-Neelsen. Sin embargo, aunque esta parasitosis es relativamente fácil de diagnosticar cuando los ooquistes se excretan en altos números, a menudo se excretan de forma irregular o en cantidades bajas (por debajo del nivel de detección por microscopía) como se ha demostrado en varios casos descritos en la

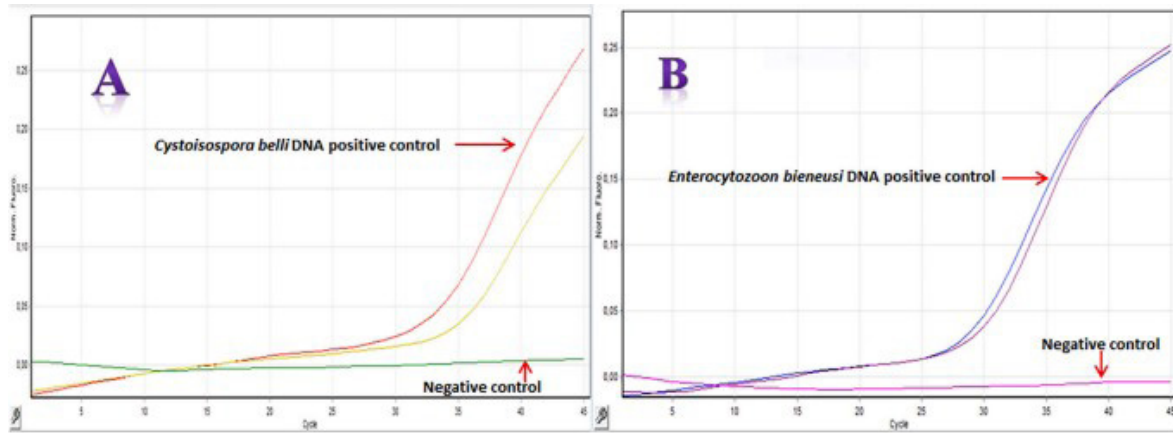


**Fig. 3.** Análisis filogenético de 3 aislamientos cubanos de *Cyclospora cayetanensis* utilizando como diana el ARNr 18S. Se incluyen los números de acceso del NCBI. Las secuencias cubanas están en el cuadro rojo. Distancias evolutivas calculadas utilizando el método de 2 parámetros de Kimura agrupadas por el método unión al vecino

literatura. En tales casos, los enfoques moleculares, particularmente la PCR en tiempo real son muy útiles en la detección de esta coccidia intestinal. <sup>(23)</sup>

Entre los microsporidios intestinales, *Enterocytozoon bieneusi* y *Encephalitozoon intestinalis* son las especies más importantes en las infecciones humanas. Se han identificado microsporidios en aproximadamente 50 % de

los pacientes con sida que padecen diarrea crónica, siendo *E. bieneusi* la más frecuente diagnosticada. El diagnóstico de microsporidios en muestras de heces mediante microscopía óptica es un desafío debido a su pequeño tamaño ([1-4]  $\mu\text{m}$ ; Stentiford *et al.*, 2016) en la tinción tricrómica modificada. La utilización de un panel adecuado de procedimientos diagnósticos es recomendada para identificar a



**Fig. 4.** Diagnóstico molecular de *Cystoisospora belli* (A) y *Enterocytozoon bienersi* (B) mediante PCR en tiempo real, en un paciente inmunodeficiente con diarrea crónica

los agentes infecciosos responsables de diarrea crónica en pacientes inmunodeficientes, lo que realza la implementación de las técnicas moleculares en la identificación de estos patógenos intestinales. <sup>(24)</sup>

## Conclusiones

En resumen, los estudios moleculares realizados permitieron la introducción de herramientas diagnósticas para la detección molecular de protozoos intestinales asociados con cuadros gastrointestinales y contribuyó al fortalecimiento del diagnóstico integrado de protozoos intestinales de importancia médica que repercuten en un programa de parasitosis intestinal más fortalecido y sostenible.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Clark NJ, Owada K, Ruberanziza E, Ortu G, Umulisa I, Bayisenge U, *et al.* Parasite associations predict infection risk: incorporating co-infections in predictive models for neglected tropical diseases. *Parasit Vectors.* 2020;13:138.
- Mmbaga BT, Houpt ER. *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in children: A Review. *Pediatr Clin North Am.* 2017;64:837-50.
- Santoemma PP, Ison MG, Angarone MP. Newer approaches in diagnosis of diarrhea in immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis.* 2019;32:461-7.
- Cacciò SM, De Giacomo M, Pozio E. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *Int J Parasitol.* 2002;32:1023-30.
- Bertrand IL, Albertini L, Schwartzbrod J. Comparison of two target genes for detection and genotyping of *Giardia lamblia* in human faeces by PCR and PCR- restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 2005;43:5940-4.
- Read C, Walters J, Robertson, ID, Thompson, RC. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *Int J Parasitol* 2002;32:229-31.
- Laude A, Valot S, Desoubeaux G, Argy N, Nourrisson C, Pomares C, *et al.* Is real-time PCR-based diagnosis similar in performance to routine parasitological examination for the identification of *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum*/*Cryptosporidium hominis* and *Entamoeba histolytica* from stool samples? Evaluation of a new commercial multiplex PCR assay and literature review. *Clin. Microbiol. Infect.* 2016;22:190.e1-190.e8.
- Dashti A, Alonso H, Escolar-Miñana C, Köster PM, Bailo B, Carmena D. Evaluation of a Novel Commercial Real-Time PCR Assay for the simultaneous detection of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Entamoeba histolytica*. *Microbiol Spectr.* 2022;10(3):e0053122.
- Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Evaluation of three diagnostic methods, including real-time PCR, for detection of *Dientamoeba fragilis* in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2006;44:232-5.
- Liu H, Shen Y, Yin J, Yuan Z, Jiang Y, Xu Y, *et al.* Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon*, *Giardia* and *Cyclospora* in diarrheal outpatients in China. *BMC Infect Dis* 2014;14:19-25.
- Hadfield SJ, Robinson G, Elwin K, Chalmers RM. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in human clinical samples by use of real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2011;49:918-24.
- Ten Hove RJ, van Lieshout L, Brienen EAT, Aranta Perez M, Verweij JJ. Real-time polymerase chain reaction for detection of *Isospora belli* in stool samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis* 2008;61:280-3.
- Menotti J, Cassinat B, Porcher R, Sarfati C, Derouin F, Molina JM. Development of a real-time polymerase-chain-reaction assay for quantitative detection of *Enterocytozoon bienersi* DNA in stool specimens from immunocompromised patients with intestinal microsporidiosis. *J. Infect. Dis.* 2003a;187:1469-74.
- Menotti J, Cassinat B, Sarfati C, Liguory O, Derouin F, Molina JM. Development of a real-time PCR assay for quantitative de-



- tection of *Encephalitozoon intestinalis* DNA. *J. Clin. Microbiol.* 2003b;41:1410-3.
15. Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AH. Epi Info version 6: A World processing, database, and statistics program for epidemiology on microcomputers. Atlanta, GA: Centers for Disease Control. 1994.
  16. Escobedo AA, Almirall P, Hanevik K, Cimerman S, Rodríguez-Morales AJ, Almanza C, et al. Giardiasis: a diagnosis that should be considered regardless of the setting. *Epidemiol Infect.* 2018;146:216-8.
  17. Cotton JA, Beatty JK, Buret AG. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *Int J Parasitol* 2011;41:925-33.
  18. Ahmad AA, El-Kady AM, Hassan TM. Genotyping of *Giardia duodenalis* in children in Upper Egypt using assemblage-specific PCR technique. *PLoS One.* 2020;15(10):e0240119.
  19. Cañete R, Díaz MM, Avalos García R, Laúd Martínez PM, Manuel Ponce F. Intestinal parasites in children from a day care centre in Matanzas City, Cuba. *PLoS One.* 2012;7:e51394.
  20. Parcina M, Reiter-Owona I, Mockenhaupt FP, Vojvoda V, Gahutu JB, Hoerauf A. Highly sensitive and specific detection of *Giardia duodenalis*, *Entamoeba histolytica*, and *Cryptosporidium* spp. in human stool samples by the BD MAX™ enteric parasite panel. *Parasitol. Res.* 2018;117:447-51.
  21. Núñez FA, González OM, González I, Escobedo AA, Cordoví RA. Intestinal coccidia in Cuban pediatric patients with diarrhea. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;98:539
  22. Wang ZD, Liu Q, Liu HH, Li S, Zhang L, Zhao YK, Zhu XQ. Prevalence of *Cryptosporidium*, *microsporidia* and *Isospora* infection in HIV-infected people: a global systematic review and meta-analysis. *Parasit. Vectors.* 2018;11:28542.
  23. Dubey JP, Almeria S. *Cystoisospora belli* infections in humans: the past 100 years. *Parasitol.* 2019;146:1490-1527.
  24. Khanduja S, Ghoshal U, Agarwal V, Pant P, Ghoshal UC. Identification and genotyping of *Enterocytozoon bienersi* among human immunodeficiency virus infected patients. *J. Infect Public Health.* 2017;10:31-40.

---

Recibido: 24/12/2024

Aprobado: 21/1/2025

---

### Conflictos de intereses

Los autores declaran que no tienen intereses económicos en competencia o relaciones personales conocidas que puedan haber influido en el trabajo informado en este artículo. Los autores no presentan conflicto de intereses en relación con el artículo.

### Contribuciones de los autores

- Conceptualización: Luis Enrique Jerez Puebla, Fidel Ángel Núñez Fernández
- Curación de datos: Fidel Ángel Núñez Fernández, Luis Enrique Jerez Puebla, Lucy Robertson, Norbert Müller, Jorge Fraga Nodarse
- Análisis formal: Fidel Ángel Núñez Fernández, Luis Enrique Jerez Puebla, Lucy Robertson, Jorge Fraga Nodarse, Norbert Müller, Jorge Pérez Ávila, Lissette Pérez Santos
- Investigación: Luis Enrique Jerez Puebla, Fidel Ángel Núñez Fernández, Lucy Robertson, Norbert Müller, Lissette Pérez Santos, Jorge Fraga Nodarse, Iredys Cruz Rodríguez, Irais Atencio Millán, Isabel Martínez Silva, Lucía Ayllón Valdés, Yanet Pintos Saavedra, Jorge Pérez Ávila, Lázara Rojas Rivero, Yanet Fresco Sampedro
- Metodología: Luis Enrique Jerez Puebla, Fidel Ángel Núñez Fernández, Lucy Robertson, Norbert Müller, Jorge Fraga Nodarse, Lissette Pérez Santos, Yanet Fresco Sampedro, Laura Rodríguez Moreno, Iredys Cruz Rodríguez, Isabel Martínez Silva, Lucía Ayllón Valdés
- Supervisión: Fidel Ángel Núñez Fernández, Lucy Robertson, Jorge Fraga Nodarse, Lázara Rojas Rivero, Norbert Müller, Jorge Pérez Ávila
- Redacción-borrador original: Luis Enrique Jerez Puebla
- Redacción-revisión y edición: Luis Enrique Jerez Puebla, Fidel Ángel Núñez Fernández, Lucy Robertson, Jorge Fraga Nodarse

### Financiamientos

Los estudios que conformaron la investigación no recibieron ningún financiamiento externo.

### Cómo citar este artículo

Jerez Puebla LE, Núñez Fernández FA, Fraga Nodarse J, J. Robertson L, Martínez Silva I, Ayllón Valdés L, et al. Impacto de la implementación del diagnóstico molecular de protozoos intestinales de importancia médica en el Departamento de Parasitología del IPK. *An Acad Cienc Cuba* [Internet] 2025 [citado en día, mes y año];15(1):e2893. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/2893>

El artículo se difunde en acceso abierto según los términos de una licencia Creative Commons de Atribución/Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0), que le atribuye la libertad de copiar, compartir, distribuir, exhibir o implementar sin permiso, salvo con las siguientes condiciones: reconocer a sus autores (atribución), indicar los cambios que haya realizado y no usar el material con fines comerciales (no comercial).

© Los autores, 2025.

