Research Club Scientia Vol. 4, No 4
Frecuencia: Octubre - Diciembre
ISSN: 3103 - 1315
DOI: https://doi.org/10.65415/gc0sza03

Caracterización molecular del micobioma intestinal mediante secuenciación ITS2–NGS en un caso de VIH con síndrome diarreico

Molecular Characterization of the Intestinal Mycobiome Using ITS2–NGS Sequencing in a Case of HIV with Diarrheal Syndrome

Caratterizzazione molecolare del micobioma intestinale mediante sequenziamento ITS2–NGS in un caso di HIV con sindrome diarroica

Wilson Luis Torres Torres[1]
Email: wilson.torres@cnel.gob.ec
ORCID: https://orcid.org/0009-0009-0518-2695

María Belén Castillo Narea[2]
Email: belen.castillo@ucacue.edu.ec
ORCID: https://orcid.org/0009-0003-8486-0605

Carlos Dario Aguilar Granados[3]
Email: carlosd.aguilar@educacion.gob.ec
ORCID: https://orcid.org/0009-0002-2827-5295

Andy Jordan Salcedo Rodríguez[4]
Email: andyjordansalcedo@gmail.com
ORCID: https://orcid.org/0009-0001-2798-0841

Betty Judith Pazmiño Gómez[5]
Email: bpazminog@unemi.edu.ec
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2611-2428

Correspondencia: Betty Judith Pazmiño Gómez[5] **Email:** bpazminog@unemi.edu.ec

Artículo de investigación

* **Recibido:** 15-09-2026 * **Aceptado:** 30-09-2026 * **Publicado:** 14-11-2026

1. Corporación Nacional de Electricidad (CNEL EP), Ecuador.
2. Facultad de Criminología y Ciencias Forenses, Universidad Católica de Cuenca, Ecuador.
3. Unidad Educativa Paulino Milán Herrera, Milagro, Ecuador.
4. Facultad de Ciencias e Ingeniería, Universidad Estatal de Milagro, Milagro, Ecuador.
5. Facultad de Salud y Servicios Sociales, Universidad Estatal de Milagro, Milagro, Ecuador.

Resumen

El objetivo fue caracterizar la composición taxonómica y la diversidad fúngica de una muestra fecal de un paciente con VIH y síndrome diarreico mediante secuenciación de amplicones ITS2. Se realizó un estudio observacional descriptivo de caso único. El ADN extraído se amplificó mediante PCR con los cebadores ITS86F e ITS4; posteriormente, se prepararon bibliotecas y se efectuó la secuenciación en una plataforma Illumina MiSeq. La clasificación taxonómica original utilizó un clasificador bayesiano RDP y la base de datos UNITE. El análisis original reportó 36.597 lecturas, 147 especies y un índice de Shannon de 1,05. La categoría «sin clasificar a nivel de especie» agrupó 25.494 lecturas (69,66 %), mientras que *Saccharomyces* destacó entre las categorías taxonómicas identificadas. El perfil molecular mostró una resolución taxonómica incompleta.

Palabras clave: micobioma intestinal; ITS2; secuenciación de nueva generación; Saccharomyces; VIH.

Abstract

The objective was to characterize the taxonomic composition and fungal diversity of a fecal sample from a patient with HIV and diarrheal syndrome using ITS2 amplicon sequencing. A descriptive, observational single-case study was conducted. The extracted DNA was amplified by PCR using the ITS86F and ITS4 primers; subsequently, libraries were prepared and sequencing was performed on an Illumina MiSeq platform. The original taxonomic classification used an RDP Bayesian classifier and the UNITE database. The original analysis reported 36,597 reads, 147 species, and a Shannon index of 1.05. The “unclassified at the species level” category accounted for 25,494 reads (69.66%), while Saccharomyces stood out among the identified taxonomic categories. The molecular profile showed incomplete taxonomic resolution.

Keywords: gut mycobiome; ITS2; next-generation sequencing; Saccharomyces; HIV.

Riassunto

L’obiettivo era caratterizzare la composizione tassonomica e la diversità fungina di un campione fecale proveniente da un paziente affetto da HIV e sindrome diarroica mediante sequenziamento di ampliconi ITS2. È stato condotto uno studio osservazionale descrittivo su un singolo caso. Il DNA estratto è stato amplificato mediante PCR con i primer ITS86F e ITS4; successivamente, sono state preparate le librerie ed è stato effettuato il sequenziamento su una piattaforma Illumina MiSeq. La classificazione tassonomica originale ha utilizzato un classificatore bayesiano RDP e il database UNITE. L’analisi originale ha riportato 36.597 letture, 147 specie e un indice di Shannon pari a 1,05. La categoria «non classificata a livello di specie» raggruppava 25.494 letture (69,66 %), mentre il genere Saccharomyces spiccava tra le categorie

tassonomiche identificate. Il profilo molecolare ha mostrato una risoluzione tassonomica incompleta.

Parole chiave: micobioma intestinale; ITS2; sequenziamento di nuova generazione; Saccharomyces; HIV.

Introducción

El micobioma intestinal constituye el componente fúngico del microbioma gastrointestinal humano y, aunque ha recibido menor atención que su componente bacteriano, presenta una composición taxonómica heterogénea y variable entre individuos. Los estudios de secuenciación de ADN fúngico en muestras fecales han identificado levaduras de los géneros *Saccharomyces*, *Candida* y *Malassezia*, junto con otros taxones detectados de manera menos constante (Nash et al., 2017). Sin embargo, la detección de ADN fúngico en heces no demuestra necesariamente colonización intestinal persistente, dado que algunas secuencias pueden proceder de hongos presentes en los alimentos o en el ambiente (Hallen-Adams y Suhr, 2017; Lai et al., 2023).

En personas con VIH, la caracterización del micobioma intestinal mediante secuenciación ITS2 ha identificado diferencias en la riqueza y composición fúngica respecto de individuos sin VIH, junto con una considerable variabilidad interindividual (Gosalbes et al., 2022). En un estudio longitudinal que incluyó personas con y sin VIH, Abdillah et al. (2025) observaron una detección irregular de secuencias asignadas a *Malassezia* entre muestreos sucesivos, lo que limita su interpretación como evidencia de persistencia intestinal. Estos antecedentes destacan la importancia de considerar la variabilidad taxonómica y temporal al interpretar perfiles fúngicos obtenidos mediante secuenciación de ADN.

La región ITS2 del ADN ribosomal nuclear constituye un marcador utilizado para la caracterización molecular de comunidades fúngicas mediante secuenciación de amplicones, debido a su variabilidad entre taxones (Ihrmark et al., 2012). Su amplificación mediante PCR, seguida de secuenciación de nueva generación (NGS) y clasificación bioinformática con bases de datos especializadas como UNITE, permite describir la composición taxonómica de comunidades fúngicas sin necesidad de cultivo (Nilsson et al., 2019). Sin embargo, los sesgos de amplificación y las limitaciones de las secuencias de referencia pueden afectar la representación de determinados taxones y su resolución taxonómica. Por ello, las proporciones de lecturas obtenidas no deben interpretarse como estimaciones directas de la abundancia de organismos fúngicos (Ihrmark et al., 2012; Nilsson et al., 2019).

La investigación se orientó a caracterizar la composición taxonómica y la diversidad del micobioma intestinal mediante secuenciación de amplicones ITS2–NGS, a partir de una muestra fecal de un paciente con VIH y síndrome diarreico. El procedimiento comprendió la extracción de ADN, la amplificación de la región ITS2 mediante PCR con los cebadores ITS86F e ITS4, la preparación de bibliotecas para secuenciación de nueva generación y el análisis bioinformático de las secuencias obtenidas mediante el clasificador RDP y la base de datos UNITE, para identificar los taxones fúngicos y describir su distribución de abundancias relativas.

La estructura del manuscrito comprende las secciones de Metodología, Resultados, Discusión y Conclusiones, en las que se describen los procedimientos moleculares empleados, la

composición y diversidad fúngicas identificadas, la interpretación de los hallazgos y sus principales alcances.

Metodología

2.1. Diseño del estudio y muestra biológica

Se realizó un estudio observacional, descriptivo y transversal de caso único, basado en el análisis molecular de una muestra fecal procedente de un paciente masculino de 36 años, con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y síndrome diarreico, atendido en el Hospital de Infectología Dr. José Daniel Rodríguez, Guayaquil, Ecuador. El periodo institucional de referencia comprendió de abril de 2021 a marzo de 2022. La muestra utilizada para la caracterización molecular del micobioma intestinal se identificó mediante el código 2404092-001.

2.2. Extracción de ADN fecal y control de calidad

La muestra fecal se conservó en etanol al 96 % (v/v), a 4 °C, en una proporción aproximada de 1 g de heces por 2 mL de etanol. Según el informe técnico de BioSequence S.A.S., la recepción de las muestras se registró entre el 9 y el 18 de abril de 2024. La fecha exacta de recolección de la muestra 2404092-001 no está documentada individualmente, por lo que no fue posible determinar con precisión el intervalo transcurrido hasta su recepción. Previamente a la extracción, se retiró el conservante mediante centrifugación a 10.000 × g durante 5 min y descarte del sobrenadante. Se pesaron 148,3 mg de sedimento fecal utilizando una balanza analítica con resolución de 0,1 mg. El ADN total se extrajo mediante el kit Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep (Zymo Research, EE. UU.; referencia D6010), con adaptaciones en el pretratamiento y la homogeneización mecánica respecto al procedimiento de referencia del fabricante (Zymo Research, 2021). El sedimento se transfirió a un tubo ZR BashingBead con perlas exclusivamente de 0,5 mm y se añadieron 750 µL de tampón BashingBead. La homogeneización se realizó en un Disruptor Genie (Scientific Industries, EE. UU.), equipado con soporte para tubos de 2 mL, a velocidad máxima (aproximadamente 2.850 rpm) durante 10 min continuos. No se utilizó β-mercaptoetanol durante la extracción.

Posteriormente, el lisado se centrifugó a ≥10.000 × g durante 1 min y se transfirieron hasta 400 µL del sobrenadante a un filtro Zymo-Spin III-F, seguido de centrifugación a 8.000 × g durante 1 min. Al filtrado se añadieron 1.200 µL de tampón de lisis genómica y la mezcla se procesó en una columna Zymo-Spin IICR mediante dos cargas sucesivas de 800 µL, centrifugadas a 10.000 × g durante 1 min cada una, con descarte del filtrado entre ambas cargas. La purificación continuó con 200 µL de tampón DNA Pre-Wash y 500 µL de tampón g-DNA Wash, con centrifugación a 10.000 × g durante 1 min en cada etapa. El ADN se eluyó con 100 µL de tampón DNA Elution mediante centrifugación a 10.000 × g durante 30 s. Finalmente, se utilizó un filtro Zymo-Spin III-HRC, previamente acondicionado con 600 µL de solución de

preparación y centrifugado a 8.000 × g durante 3 min. El ADN eluido se transfirió al filtro acondicionado y se centrifugó a 16.000 × g durante 3 min. Como control negativo del procedimiento, se procesó en paralelo un blanco de extracción preparado con 750 µL de tampón BashingBead, sin muestra fecal.

La concentración de ADN bicatenario se determinó mediante fluorometría utilizando un Qubit 4 Fluorometer y el kit Qubit dsDNA HS (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.), con 2 µL del eluido. La integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, empleando 5 µL de eluido, a 100 V durante 35 min, con tinción SYBR Safe. Como referencia de tamaño molecular se utilizó GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, EE. UU.), con un intervalo de 75–20.000 pb, cargando 5 µL en un pocillo independiente. La integridad cualitativa «Ok» se definió por la presencia de una banda predominante de ADN de alto peso molecular (>10 kb), con arrastre leve y sin degradación severa. Los criterios de aceptación establecidos fueron una concentración de ADN ≥5 ng/µL, un volumen de eluido ≥20 µL, una integridad cualitativa «Ok» y la obtención de una banda del tamaño esperado mediante amplificación de prueba con los cebadores ITS86F/ITS4. Los resultados del control de calidad se presentan en la Tabla 1.

2.3. Amplificación por PCR de la región ITS2

La región del espaciador interno transcrito 2 (ITS2) del ADN ribosomal fúngico se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los cebadores ITS86F e ITS4, previamente evaluados para la caracterización molecular de comunidades fúngicas (Op De Beeck et al., 2014; Vancov & Keen, 2009). Ambos oligonucleótidos incorporaron extensiones de Illumina (overhangs) en sus extremos 5′. La secuencia completa del cebador ITS86F fue

5′-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-GTGAATCATCGAATCTTTGAA-3′

mientras que la correspondiente al cebador ITS4 fue

5′-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′

Cada reacción se preparó en un volumen final de 25 µL, compuesto por 12,5 µL de KAPA HiFi HotStart ReadyMix 2× (Roche), 5 µL de cada cebador a 1 µM (concentración final de 0,2 µM) y 2,5 µL de ADN molde previamente diluido 1:5 en agua libre de nucleasas, con una concentración aproximada de 5,2 ng/µL.

La amplificación se realizó en un termociclador Veriti 96-Well (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), con tapa calefactada a 105 °C. El programa comprendió una desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, alineamiento a 55 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 30 s. Se aplicó

una extensión final a 72 °C durante 5 min y mantenimiento a 4 °C. Se efectuó una amplificación de prueba independiente como criterio de aceptación del ADN, incluyendo un control sin ADN molde y el blanco de extracción. Para generar los amplicones destinados a la biblioteca se prepararon dos reacciones idénticas de 25 µL, a partir de la misma mezcla maestra y procesadas en la misma corrida de termociclado. Se incluyó adicionalmente un control de PCR sin ADN molde, preparado como reacción independiente.

Una de las reacciones se destinó a la verificación electroforética, empleando 5 µL de producto en un gel de agarosa al 2 %, con tinción SYBR Safe y un marcador GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific), a 100 V durante 40 min. Se estableció como criterio de aceptación la presencia de una banda en el intervalo esperado de aproximadamente 370–520 pb; en caso contrario, se descartaba el producto y se repetía la amplificación. La segunda reacción se mantuvo íntegra hasta completar la verificación y se destinó a la preparación de la biblioteca. Los 25 µL de producto se purificaron mediante perlas magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter), en una proporción de 0,8× (20 µL de perlas por 25 µL de producto), con incubación durante 5 min a temperatura ambiente y separación magnética durante 2 min. Se realizaron dos lavados con 200 µL de etanol al 80 %, de 30 s cada uno, seguidos de secado al aire durante aproximadamente 10 min. Finalmente, el ADN se eluyó con 27,5 µL de Tris-HCl 10 mM (pH 8,5), recuperándose 25 µL de amplicón purificado para la posterior preparación de la biblioteca ITS2.

Los controles negativos de amplificación, incluido el blanco de extracción, se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa y no fueron sometidos a secuenciación.

2.4. Preparación y control de calidad de la biblioteca ITS2

Los amplicones ITS2 previamente purificados, obtenidos con cebadores que incorporaban extensiones de Illumina en sus extremos 5′ (*overhangs*), se sometieron a una segunda PCR para añadir los índices duales y las secuencias adaptadoras de secuenciación, siguiendo la estrategia de preparación de bibliotecas de amplicones descrita por Illumina (2013). Se empleó el Nextera XT Index Kit v2, Set A (Illumina), con los índices A-N704 (i7) y A-S507 (i5), correspondientes a las dos posiciones de indexación (Illumina, s. f.). Cada reacción se preparó en un volumen final de 50 µL, compuesto por 25 µL de KAPA HiFi HotStart ReadyMix 2× (Roche), 5 µL de amplicón purificado, 5 µL de cada cebador de indexación (A-N704 y A-S507), utilizados directamente del kit comercial sin dilución previa, y 10 µL de agua libre de nucleasas. La amplificación se realizó en un termociclador Veriti 96-Well (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), con desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, seguida de ocho ciclos de 95 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s. Se aplicó una extensión final a 72 °C durante 5 min y mantenimiento a 4 °C.

Los productos indexados se purificaron mediante perlas magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter), utilizando una proporción de 1,12× (56 µL de perlas por 50 µL de reacción).

La mezcla se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se mantuvo durante 2 min en un soporte magnético antes de retirar el sobrenadante. Se efectuaron dos lavados con 200 µL de etanol al 80 %, durante 30 s cada uno, seguidos de secado al aire durante aproximadamente 10 min. El ADN se eluyó con 27,5 µL de Tris-HCl 10 mM (pH 8,5), con incubación de 2 min a temperatura ambiente y separación magnética durante otros 2 min, recuperándose 25 µL de biblioteca purificada.

El tamaño de la biblioteca se evaluó mediante TapeStation 4150 con el kit D1000 (Agilent Technologies), y su concentración mediante fluorometría con Qubit 4 y el kit Qubit dsDNA HS (Thermo Fisher Scientific). La concentración molar se estimó a partir de la concentración másica y el tamaño medio de la biblioteca, utilizando una masa molecular promedio de 660 g/mol por par de bases (Illumina, 2013). Se incluyó un control negativo de indexación con agua libre de nucleasas en sustitución del amplicón, que se evaluó mediante TapeStation y no se sometió a secuenciación. Los criterios de aceptación previamente establecidos comprendieron un tamaño de biblioteca entre 400 y 700 pb, ausencia de dímeros visibles, concentración mínima de 4 nM y volumen disponible de al menos 10 µL. Los resultados del control de calidad de la biblioteca se presentan en la Tabla 1.

2.5. Secuenciación de nueva generación y procesamiento bioinformático

La biblioteca indexada de amplicones ITS2 se secuenció en la plataforma Illumina MiSeq, utilizando el MiSeq Reagent Kit v3 de 600 ciclos, con lecturas pareadas de 2 × 300 pb y una configuración de 301-8-8-301 ciclos. La biblioteca se diluyó a 4 nM, se desnaturalizó con NaOH 0,2 N y se cargó a una concentración final de 12 pM, incorporando un 15 % de control PhiX. La desmultiplexación mediante los índices A-N704 (i7) y A-S507 (i5), así como la generación de archivos FASTQ, se efectuaron mediante MiSeq Reporter, utilizando el flujo GenerateFASTQ (Illumina, 2015).

Los archivos FASTQ generados durante la secuenciación fueron sometidos a procedimientos de control y filtrado de calidad. La clasificación taxonómica se realizó mediante una implementación del clasificador bayesiano del Ribosomal Database Project (RDP), utilizando como referencia la base de datos UNITE Fungal ITS (Wang et al., 2007). De acuerdo con el informe técnico de secuenciación de BioSequence S.A.S. (reporte BSRT_2417_0004_UNEMI_KRODAS, del 21 de mayo de 2024), la referencia taxonómica utilizada correspondió a UNITE general FASTA release, versión 01.12.2017 (UNITE Community, 2017). Las asignaciones taxonómicas se conservaron conforme al procesamiento bioinformático original, sin efectuar un reprocesamiento independiente de las lecturas.

2.6. Evaluación de la diversidad alfa y abundancia relativa

La diversidad alfa del micobioma intestinal se caracterizó mediante la riqueza de especies y el índice de Shannon, considerando los indicadores reportados en el análisis taxonómico

original (Hill, 1973; Shannon, 1948). La riqueza se expresó como el número de especies reportadas, diferenciándose de los recuentos de lecturas y de las categorías taxonómicas con menor resolución. Ambos indicadores se conservaron conforme a los resultados originales, sin efectuar recalculaciones independientes.

Las abundancias relativas se calcularon dividiendo el número de lecturas de cada categoría taxonómica entre el total original de 36.597 lecturas y multiplicando el resultado por 100. Los porcentajes se expresaron con dos decimales y se representaron mediante RStudio, diferenciando las asignaciones a nivel de género, aquellas con denominaciones binomiales y las lecturas sin clasificación a nivel de especie. La diferencia entre el total de lecturas y la suma de las categorías desglosadas se registró como «lecturas restantes no desglosadas», sin atribuirle una identidad taxonómica.

Dado que se analizó una única muestra biológica, el tratamiento estadístico fue exclusivamente descriptivo, sin realizar comparaciones entre grupos ni pruebas de hipótesis.

2.7. Análisis descriptivo complementario de la resolución taxonómica de Saccharomyces

Se realizó un análisis descriptivo complementario mediante Python en Google Colab, utilizando los recuentos originales de cuatro categorías taxonómicas: *Saccharomyces* sp., *S. eubayanus*, *S. kudriavzevii* y *S. mikatae*. Los datos se organizaron mediante la biblioteca pandas y se representaron gráficamente con matplotlib.

Las proporciones relativas se calcularon dividiendo el recuento de cada categoría entre las 9.527 lecturas correspondientes a las cuatro categorías desglosadas y multiplicando el resultado por 100. Se diferenciaron las asignaciones resueltas únicamente a nivel de género de aquellas etiquetadas con nombres binomiales, sin asumir una validación independiente de estas últimas a nivel de especie. La distribución se representó mediante una barra horizontal apilada normalizada al 100 % (Figura 2).

Resultados

Caracterización molecular y control de calidad del ADN y de la biblioteca ITS2

El ADN extraído cumplió los criterios cualitativos de control de calidad consignados para la muestra analizada. Los resultados de cuantificación y caracterización de la biblioteca ITS2 se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Características del ADN extraído y de la biblioteca de secuenciación ITS2

Parámetro	Resultado
Identificador de la muestra	2404092-001
Material biológico	Heces
Integridad del ADN	Ok
Concentración del ADN extraído	26,00 ng/µL
Cumplimiento del control de calidad	Sí
Región molecular amplificada	ITS2
Códigos de indexación	A-N704 / A-S507
Tamaño aproximado de la biblioteca	≈ 525 pb
Concentración de la biblioteca	4,83 ng/µL

Nota. Las expresiones «Ok» y «Sí» corresponden a evaluaciones cualitativas del control de calidad. El tamaño aproximado de 525 pb corresponde a la biblioteca de secuenciación y no necesariamente a la longitud del amplicón ITS2.

Secuenciación ITS2 y diversidad alfa del micobioma intestinal

La secuenciación de amplicones ITS2 generó un conjunto de lecturas con diferentes niveles de asignación taxonómica. Los indicadores de secuenciación y diversidad alfa se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Indicadores de secuenciación y diversidad alfa del micobioma intestinal

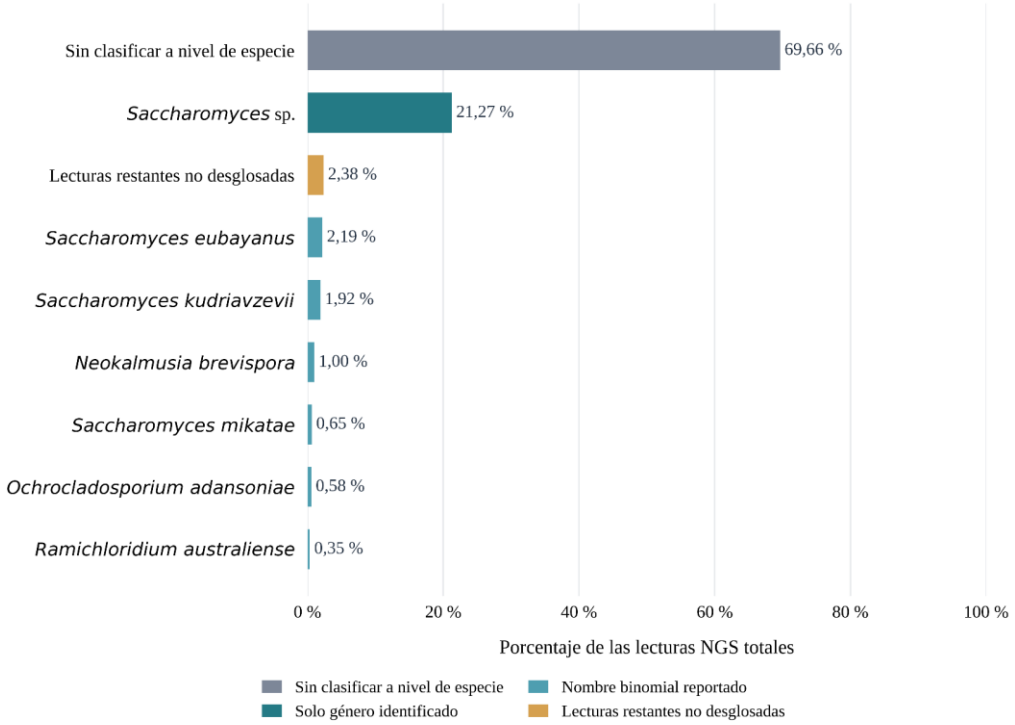
Indicador	Resultado
Lecturas NGS totales reportadas	36.597
Lecturas sin clasificación a nivel de especie	25.494
Porcentaje sin clasificación a nivel de especie	69,66%
Riqueza de especies reportada	147
Índice de diversidad de Shannon (H′)	1,05

Nota. El índice de Shannon y la riqueza de especies corresponden a los resultados del análisis bioinformático disponible y no fueron recalculados independientemente. La categoría «sin clasificar a nivel de especie» no comprende necesariamente todas las lecturas sin identificación específica, dado que otras categorías presentan asignaciones únicamente a nivel de género.

Composición taxonómica y abundancia relativa del micobioma intestinal

Entre las categorías con asignación taxonómica, *Saccharomyces* sp. presentó la mayor abundancia relativa, seguida de las asignaciones a *S. eubayanus* y *S. kudriavzevii*. Los demás taxones identificados mostraron una representación proporcionalmente menor. La distribución de las lecturas según las categorías taxonómicas reportadas se presenta en la Figura 1.

Figura 1. Distribución de lecturas ITS2 según las categorías taxonómicas reportadas.

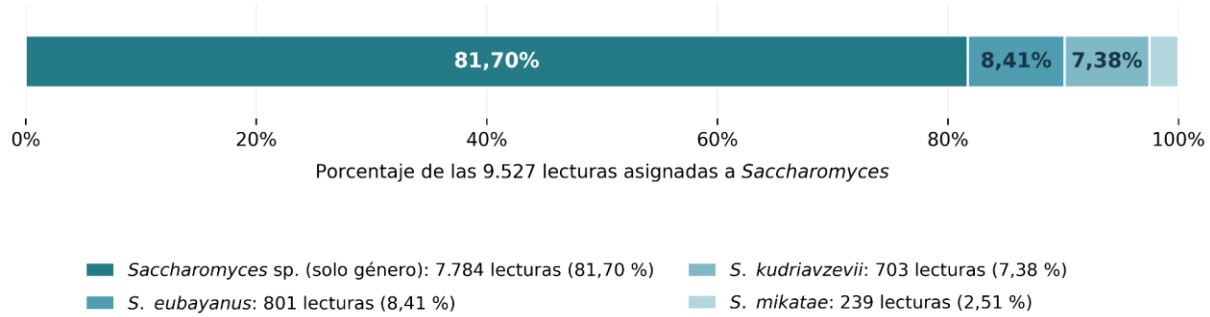


Nota. Los porcentajes se calcularon respecto al total de 36.597 lecturas obtenidas mediante secuenciación ITS2. Las 870 lecturas restantes (2,38 %) corresponden a la diferencia entre el total de lecturas y las categorías taxonómicas desglosadas, sin una asignación individual documentada.

Resolución taxonómica de las lecturas asignadas al género Saccharomyces

Las cuatro categorías taxonómicas atribuidas a *Saccharomyces* comprendieron 9.527 lecturas, equivalentes al 26,03 % del total de secuenciación. Dentro de este conjunto, el 81,70 % correspondió a asignaciones únicamente a nivel de género, mientras que el 18,30 % restante se distribuyó entre tres categorías con nombres binomiales (Figura 2).

Figura 2. Distribución de las asignaciones taxonómicas dentro del género Saccharomyces.



Nota. Los porcentajes se calcularon respecto a las 9.527 lecturas correspondientes a las cuatro categorías de Saccharomyces desglosadas. Las asignaciones con nombres binomiales no representan una validación independiente de la identificación a nivel de especie.

Discusión

La caracterización molecular mediante ITS2–NGS permitió documentar la diversidad fúngica de la muestra analizada, con un índice de Shannon de 1,05 reportado en el análisis original. Este indicador integra la riqueza y la equidad de los taxones, aunque su interpretación depende de la distribución de abundancias y del procesamiento bioinformático utilizado. Nash et al. (2017), mediante secuenciación ITS2 de muestras fecales de adultos sanos, documentaron una marcada variabilidad interindividual e intraindividual en la composición del micobioma intestinal. Los resultados del presente estudio constituyen una caracterización descriptiva de caso único y no permiten establecer alteraciones de la diversidad fúngica atribuibles a la infección por VIH ni asociaciones con el síndrome diarreico.

La representación destacada del género *Saccharomyces* entre las categorías taxonómicas desglosadas constituye un rasgo relevante de la composición fúngica observada. Auchtung et al. (2018), mediante secuenciación ITS2 de muestras fecales, observaron que *Saccharomyces* descendió hasta niveles indetectables en un voluntario sano tras restringir el consumo de alimentos que contenían *S. cerevisiae*. Este hallazgo destaca la necesidad de distinguir la detección transitoria de ADN fúngico de la colonización intestinal persistente. Por tanto, las asignaciones a *Saccharomyces* en la muestra analizada no permiten determinar su origen, viabilidad ni permanencia en el tracto gastrointestinal.

Las lecturas agrupadas bajo la categoría original «sin clasificar a nivel de especie» evidencian una resolución taxonómica incompleta en el análisis ITS2–NGS. Nilsson et al. (2019) señalaron que las bases de datos de referencia del marcador ITS pueden contener secuencias con anotaciones taxonómicas incompletas o inconsistentes, lo que dificulta la identificación de determinados linajes fúngicos. Sin embargo, la información disponible no permite establecer las causas específicas de esta falta de resolución. En consecuencia, las 147 especies reportadas deben interpretarse como resultado de la clasificación bioinformática original y no como un inventario exhaustivo de la diversidad fúngica presente en la muestra. Asimismo, la ausencia de asignación específica no constituye evidencia de especies nuevas o previamente no descritas.

La reproducibilidad del análisis ITS2–NGS depende de la documentación de los procedimientos de procesamiento de lecturas y clasificación taxonómica. Aunque el informe técnico original identifica el clasificador RDP y la versión de referencia UNITE utilizada, no detalla los parámetros de filtrado de calidad, los umbrales de confianza para la asignación taxonómica ni la versión específica de la implementación de RDP. Bokulich et al. (2018) demostraron que la precisión de la clasificación de amplicones, incluidos los marcadores ITS fúngicos, varía según el método y su configuración. Esta documentación incompleta limita la reproducción exacta del análisis y la evaluación de los posibles efectos de las decisiones bioinformáticas sobre las asignaciones taxonómicas reportadas.

El intervalo prolongado entre la recolección y la recepción de la muestra constituye una limitación preanalítica adicional, dado que no se evaluó su posible influencia sobre la recuperación del ADN fúngico y la composición taxonómica detectada.

Conclusiones

La secuenciación de amplicones ITS2 mediante tecnología NGS permitió caracterizar el perfil molecular fúngico detectado en una muestra fecal de un paciente con VIH y síndrome diarreico. Entre las categorías taxonómicas identificadas, *Saccharomyces* fue el género con mayor representación, acompañado de otros taxones menos abundantes y de una proporción considerable de lecturas agrupadas bajo la categoría «sin clasificar a nivel de especie».

La riqueza y el índice de Shannon reportados complementaron la caracterización descriptiva de la muestra, aunque su interpretación está condicionada por la resolución taxonómica del análisis original. Debido al diseño de caso único, los hallazgos no permiten establecer asociaciones entre la composición fúngica y la infección por VIH o el síndrome diarreico, formular conclusiones diagnósticas ni extrapolar los resultados a otras poblaciones.

Referencias

Abdillah, A., Ravaux, I., Mokhtari, S., & Ranque, S. (2025). Do *Malassezia* yeasts colonize the guts of people living with HIV? *PLOS ONE, 20*(5), e0322982. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0322982

Auchtung, T. A., Fofanova, T. Y., Stewart, C. J., Nash, A. K., Wong, M. C., Gesell, J. R., Auchtung, J. M., Ajami, N. J., & Petrosino, J. F. (2018). Investigating colonization of the healthy adult gastrointestinal tract by fungi. *mSphere, 3*(2), e00092-18. https://doi.org/10.1128/mSphere.00092-18

Bokulich, N. A., Kaehler, B. D., Rideout, J. R., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., Huttley, G. A., & Caporaso, J. G. (2018). Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome, 6*, Article 90. https://doi.org/10.1186/s40168-018-0470-z

Gosalbes, M. J., Jimenéz-Hernandéz, N., Moreno, E., Artacho, A., Pons, X., Ruíz-Pérez, S., Navia, B., Estrada, V., Manzano, M., Talavera-Rodriguez, A., Madrid, N., Vallejo, A., Luna, L., Pérez-Molina, J. A., Moreno, S., & Serrano-Villar, S. (2022). Interactions among the mycobiome, bacteriome, inflammation, and diet in people living with HIV. *Gut Microbes, 14*(1), 2089002. https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2089002

Hallen-Adams, H. E., & Suhr, M. J. (2017). Fungi in the healthy human gastrointestinal tract. *Virulence, 8*(3), 352–358. https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1247140

Hill, M. O. (1973). Diversity and evenness: A unifying notation and its consequences. *Ecology, 54*(2), 427–432. https://doi.org/10.2307/1934352

Ihrmark, K., Bödeker, I. T. M., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J., Strid, Y., Stenlid, J., Brandström-Durling, M., Clemmensen, K. E., & Lindahl, B. D. (2012). New primers to amplify the fungal ITS2 region – evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiology Ecology, 82*(3), 666–677. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01437.x

Illumina. (s. f.). *Nextera XT Index Kit v2 contents & storage*. https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/nextera-xt-index-kit-v2/contents-storage.html

Illumina. (2013). *16S metagenomic sequencing library preparation* (Documento n.º 15044223, Rev. B). https://www.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf

Illumina. (2015). *MiSeq Reporter Generate FASTQ workflow guide* (Documento n.º 15042322, versión 01). https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/software_documentation/miseqreporter/miseq-reporter-generate-fastq-workflow-guide-15042322-01.pdf

Lai, S., Yan, Y., Pu, Y., Lin, S., Qiu, J.-G., Jiang, B.-H., Keller, M. I., Wang, M., Bork, P., Chen, W.-H., Zheng, Y., & Zhao, X.-M. (2023). Enterotypes of the human gut mycobiome. *Microbiome, 11*, Article 179. https://doi.org/10.1186/s40168-023-01586-y

Nash, A. K., Auchtung, T. A., Wong, M. C., Smith, D. P., Gesell, J. R., Ross, M. C., Stewart, C. J., Metcalf, G. A., Muzny, D. M., Gibbs, R. A., Ajami, N. J., & Petrosino, J. F. (2017). The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome, 5*, Article 153. https://doi.org/10.1186/s40168-017-0373-4

Nilsson, R. H., Larsson, K.-H., Taylor, A. F. S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T. S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F. O., Tedersoo, L., Saar, I., Kõljalg, U., & Abarenkov, K. (2019). The UNITE database for molecular identification of fungi: Handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research, 47*(D1), D259–D264. https://doi.org/10.1093/nar/gky1022

Op De Beeck, M., Lievens, B., Busschaert, P., Declerck, S., Vangronsveld, J., & Colpaert, J. V. (2014). Comparison and validation of some ITS primer pairs useful for fungal metabarcoding studies. *PLOS ONE, 9*(6), e97629. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097629

Shannon, C. E. (1948). A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal, 27*(3), 379–423. https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x

UNITE Community. (2017). *UNITE general FASTA release* (Version 01.12.2017) [Conjunto de datos]. https://doi.org/10.15156/BIO/587475

Vancov, T., & Keen, B. (2009). Amplification of soil fungal community DNA using the ITS86F and ITS4 primers. *FEMS Microbiology Letters, 296*(1), 91–96. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01621.x

Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology, 73*(16), 5261–5267. https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07

Zymo Research. (2021). *Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit* (Instruction manual, Version 2.4.5). https://www.biolabtech.com.ua/wp-content/uploads/2025/04/Quick-DNA-Fecal-Soil-Microbe.pdf