



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

FACULTAT DE FARMÀCIA
DOCTORADO EN PARASITOLÒGIA HUMANA Y ANIMAL

**PARASITOSIS INTESTINALES EN PACIENTES
CON MALABSORCIÓN A LACTOSA Y/O FRUCTOSA.
VALORACIÓN DEL EFECTO DE LA TERAPIA COMBINADA
(FARMACOLÓGICA Y NUTRICIONAL)**

Autora:

Silvia Taroncher Ferrer

Directores:

Dra. María Trelis Villanueva

Dr. Juan Francisco Merino Torres

Dr. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz

Valencia, 2019

DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA I
PARASITOLOGIA

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Parasitología Humana y Animal

**Parasitosis intestinales en pacientes con malabsorción a
lactosa y/o fructosa. Valoración del efecto de la terapia
combinada (farmacológica y nutricional)**

POR

SILVIA TARONCHER FERRER

DIRECTORES

Dra. MARÍA TRELIS VILLANUEVA

Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia, Àrea de Parasitologia, Universitat de
València

Dr. JUAN FRANCISCO MERINO TORRES

Servicio de Endocrinología y Nutrición, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Departamento de
Medicina, Área de Medicina, Universitat de València

Dr. ANTONIO OSUNA CARRILLO DE ALBORNOZ

Instituto de Biotecnología, Grupo de Bioquímica y Parasitología Molecular, Departamento de
Parasitología, Universidad de Granada

Valencia, a 19 de julio de 2019

*“प्रत्येक जीवित डर बिना जीवन बिताउन सकछ,
पीडा बिना, दुः ख को बिना,
बुद्धि संग जीवन, स्वस्थ, सफल,
राम्रो-उन्मुख र धनी। ”*



(Proverbio nepalí)

**DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA I
PARASITOLOGIA**

Av. Vicent Andrés Estellés, s/n 46100 Burjassot
Telèfon: +34 963544298 Fax: +34 963544769

Los abajo firmantes Dra. MARIA TRELIS VILLANUEVA, Profesora del Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia de la Universitat de València, Dr. JUAN FRANCISCO MERINO TORRES, Profesor del Departament de Medicina de la Universitat de València y Dr. ANTONIO OSUNA CARRILLO DE ALBORNOZ, Profesor del Instituto de Biotecnología, Grupo de Bioquímica y Parasitología Molecular de la Universidad de Granada, por la presente:

CERTIFICAN: que Doña SILVIA TARONCHER FERRER ha realizado íntegramente la Tesis Doctoral titulada “PARASITOSIS INTESTINALES EN PACIENTES CON MALABSORCIÓN A LACTOSA Y/O FRUCTOSA. VALORACIÓN DEL EFECTO DE LA TERAPIA COMBINADA (FARMACOLÓGICA Y NUTRICIONAL)” en el Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia de la Universitat de València, con el fin de optar al grado de Doctor en Farmacia.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente en Valencia a 18 de julio de dos mil diecinueve.

Fdo.:

María Trelis Villanueva

Fdo.:

J. Francisco Merino Torres

Fdo.:

Antonio Osuna Carrillo de Albornoz

Silvia Taroncher Ferrer, 2019.- Parasitosis intestinales en pacientes con malabsorción a lactosa y/o fructosa. Valoración del efecto de la terapia combinada (farmacológica y nutricional). Tesis doctoral (Dir. Dra. María Trelis Villanueva, Dr. Juan Francisco Merino Torres y Dr. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz), Facultat de Farmàcia, Universitat de València, Valencia, 2019. 203 pp.

La malabsorción de carbohidratos entre adultos es cada vez más frecuente. Estudios recientes sugieren una relación entre las parasitosis intestinales y el desarrollo de estos procesos patológicos. Las enteroparasitosis provocan cambios en la mucosa intestinal asociados con mala digestión y malabsorción de los alimentos. Este estudio ha analizado la frecuencia de parásitos intestinales en individuos adultos con trastornos gastrointestinales crónicos y diagnóstico de malabsorción a carbohidratos mediante el test de aliento. Para el diagnóstico parasitológico se combinaron técnicas convencionales con moleculares. Los parásitos detectados fueron: *Giardia intestinalis* (24,4%), *Blastocystis* sp. (12,6%), *Endolimax nana* (1,1%), *Entamoeba hartmanni* (1,1%), *Entamoeba coli* (1,1%) y *Cryptosporidium parvum* (0,7%), con una prevalencia general de parasitación del 39,8%. La combinación de técnicas diagnósticas directas e indirectas resulta imprescindible para el adecuado diagnóstico de *G. intestinalis* en este tipo de pacientes. Se ha identificado dos factores de riesgo de parasitosis en nuestro medio, las profesiones con contacto directo con humanos, así como el consumo habitual de alimentos ecológicos. A nivel analítico se detectaron déficits de vitaminas liposolubles y micronutrientes, marcadores de síndromes de malabsorción, más pronunciados en los pacientes parasitados. La parasitación por *G. intestinalis* se manifiesta frecuentemente como malabsorción a fructosa, resultando significativa dicha asociación. Tras aplicar a los pacientes parasitados una terapia combinada con antiparasitarios y manejo dietético-nutricional, se repitieron los test diagnósticos para evaluar la eficacia de la intervención. Entre los parasitados con malabsorción de fructosa, el 48,1% recuperó totalmente su capacidad de absorción y el 25,9% mejoró parcialmente; en aquellos con malabsorción inicial de lactosa, mejoraron totalmente el 41,2%, y el 37,5% lo hizo de forma parcial. La terapia combinada ha obtenido elevados índices de mejora.

PALABRAS CLAVE: Parásitos, *Giardia*, *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, malabsorción, fructosa, lactosa, antiparasitario, dieta.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer en primer lugar la oportunidad que en su día mi tutora y directora Maria Trelis Villanueva, profesora del departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología de la Universitat de València, me brindó, su total confianza en mi trabajo y en persona, y agradecerle que me impulsara a meterme en este gran proyecto que ha sido una parte muy importante de mi vida y que como bien me dijo antes de embarcarnos en esto, era una gran oportunidad y aprendería mucho profesionalmente, pero sobre todo aprendería en lo personal, y en eso no he podido tener mejor referencia, me ha enseñado a parte de técnicas, a superarme, a aprender de otros, a luchar por lo que uno quiere pase lo que pase. Estoy muy segura de que sin ti y sin tus ánimos no hubiese visto el final del túnel.

De la misma forma quiero agradecer a mi director Juan Francisco Merino Torres, del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital La Fe, la oportunidad de poder trabajar en su equipo y aprender de toda su experiencia y conocimientos.

A mi director Antonio Osuna Carrillo de Albornoz del Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada, haber compartido toda su sabiduría, todas las respuestas cuando no sabíamos por donde seguir y ser él quien creía que cada resultado, aunque fuese negativo, abría un abanico de posibilidades.

A otros profesores de la Universitat de València, Màrius Fuentes i Ferrer, Antonio Marcilla Díaz y M^a Teresa Galán Puchades, M^a Dolores Bernal Membrilla y Mónica Gonzalbo Monfort, de los que he aprendido una pasión por esta área que puede con todo. También por su apoyo y la confianza de saber que podría contar con ellos ante cualquier problema. Gracias al Departamento de Farmacia, Tecnología Farmacéutica y Parasitología en el que se encuentra integrado el Doctorado de Parasitología humana y animal, por la oportunidad de realizar mi tesis en él y abrirme un abanico de posibilidades. Asimismo, a la Universitat de València, en la que comencé mis estudios superiores y siempre me ha ofrecido diferentes opciones para el futuro.

No podía olvidarme de Anabel Bolado, que desde que empezamos juntas el Máster, me ha prestado su ayuda cuando la he necesitado, y sobre todo por estar siempre juntas en este camino a veces complicado. También Susana Cifre que ha estado ahí, siempre, en todos los momentos ayudándome y escuchándome en lo que he necesitado.

Quería dejar para el final a mi familia, a lo que están y los que ya no están, porque ellos son el principio y el final, porque nunca podría acabar de escribir todo lo agradecida que estoy por todo lo que han hecho y hacen por mí constantemente, “Gràcies per tot, vosaltres sou el més important”.

ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS

- ADA: Arginina deaminasa
- ALDO B: Aldolasa B
- BSA: Albumina de Suero Bovino
- Ct: *Cycle threshold* (ciclo umbral)
- DFA: *Direct Fluorescent Antibody* (Fluorescencia directa con anticuerpos)
- DO: Densidad Óptica
- EC: Enfermedad Celíaca
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
- EFSA: Agencia Europea de Seguridad Alimentaria
- EIA: Enzimoinmunoensayo
- EII: Enfermedad Inflamatoria Intestinal
- ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas).
- FITC: Isotiocianato de Fluoresceína
- FODMPAs: *Fermentable Oligosaccharids, monosaccharids, disaccharids and polyols* (Oligosacáridos, monosacáridos, disacáridos y polioles fermentables)
- GalNAc: N-acetilgalactosamida
- gdh: Glutamato Deshidrogenasa
- GLUT-5: *Glucosa transporter type 5* (transportador de glucosa tipo 5)
- IC: Intervalo de confianza
- ICT: Inmunocromatografía
- Ig: Inmunoglobulina
- KCl: Cloruro de potasio
- KH_2PO_4 : Fosfato monopotásico
- Na_2HPO_4 : Fosfato disódico
- NaCl: Cloruro de sodio

- NO: Óxido Nítrico
- OCI: Ornitinacarbailtransferasa
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- PBS: *Phosphate-Buffered Saline* (tampón fosfato salino)
- PBS-T: Tampón fosfato salino con Tween-20
- PCR: *Polymerase Chain Reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)
- ppm: Partes por millón
- qPCR: PCR cuantitativa o tiempo real
- SIBO: Sobrecrecimiento bacteriano
- SII: Síndrome de Intestino Irritable
- SSU-rRNA: *Small Subunit ribosomal ribonucleic acid* (subunidad pequeña del ARN ribosomal)
- STs: Subtipos
- Th: Linfocitos T *helper* (cooperadores)
- tpi: Triosa Fosfato Isomerasa
- VSP: *Variable Surface Proteins* (proteínas variables de superficie)

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Ciclo de vida de <i>G. intestinalis</i> | 35 |
| Figura 2: Formas de vida de <i>G. intestinalis</i> | 36 |
| Figura 3: Trofozoíto de <i>G. intestinalis</i> , disco adhesivo y simetría bilateral por microscopía electrónica de barrido..... | 36 |
| Figura 4: Corte transversal del trofozoíto de <i>G. intestinalis</i> , disco adhesivo por microscopía electrónica de transmisión..... | 38 |
| Figura 5: Determinantes y mecanismos de la evolución clínica de la giardiosis. Desde los casos asintomáticos, la protección frente a la diarrea aguda, a la diarrea persistente y los síndromes de malabsorción..... | 40 |
| Figura 6: Factores determinantes de la capacidad de infección de <i>G. intestinalis</i> , microbiota intestinal, cepa del parásito, co-enteropatógenos y respuesta inmunitaria del hospedador..... | 45 |
| Figura 7: Evolución de la infección por <i>Giardia</i> en el tiempo y mecanismos de defensa..... | 48 |
| Figura 8: Inmunofluorescencia directa de trofozoíto y quiste de <i>Giardia</i> con anticuerpos monoclonales marcados con FITC..... | 50 |
| Figura 9: <i>Blastocystis</i> sp.: a. forma vacuolar; b. forma granular; c. forma ameboides; d. forma quiste..... | 54 |
| Figura 10: Ciclo de vida de <i>Blastocystis</i> sp. y distribución de subtipos (St) entre animales domésticos y salvajes responsables de la transmisión zoonótica..... | 56 |
| Figura 11: Situaciones clínicas en función de la relación <i>Blastocystis</i> sp.-humano..... | 57 |
| Figura 12: Transportadores implicados en la absorción de los monosacáridos. SGLT-1: co-transportador activo de Na ⁺ por glucosa o galactosa; GLUT-5: transportador de fructosa desde la luz intestinal al interior del enterocito; GLUT-2: transportador de glucosa, galactosa y fructosa hasta los capilares sanguíneos..... | 60 |
| Figura 13: Esquema que representa los diferentes grupos y subgrupos del estudio y sus características..... | 74 |
| Figura 14: Esquema de diseño experimental e intervención terapéutica..... | 78 |

| | |
|--|-----|
| Figura 15: Escala visual EVA..... | 79 |
| Figura 16: Kit de inmunoensayo cromatográfico Simple <i>Crypto-Giardia-Entamoeba</i> (Operon®)..... | 81 |
| Figura 17: Sensibilidad y especificidad del kit Simple <i>Crypto-Giardia-Entamoeba</i> (Operon®) en función del analito y como técnica de referencia el ELISA de captura de heces..... | 81 |
| Figura 18: Presencia de la muestra, procedimiento e interpretación del Simple <i>Crypto-Giardia-Entamoeba</i> de (Operon®)..... | 82 |
| Figura 19: Quistes y oquistes observados en las muestras fecales del estudio. A: <i>Entamoeba coli</i> ; B: <i>G. intestinalis</i> ; C: <i>Endolimax nana</i> ; D: <i>Blastocystis</i> sp.; E: <i>Entamoeba hartmanni</i> ; F: <i>Cryptosporidium</i> spp..... | 83 |
| Figura 20: Material empleado y resultado final de la tinción Ziehl-Neelsen modificado sobre frotis fecales..... | 84 |
| Figura 21: Condiciones de temperatura y tiempo empleadas para la PCR a tiempo real en StepOne plus®..... | 87 |
| Figura 22: QuinTron BreathTracker TM Digital Microlyzer..... | 90 |
| Figura 23: Ejemplos de pruebas del aliento para lactosa y fructosa tras sobrecarga oral con 25 g de sustrato. Evolución de la producción de hidrógeno (ppm: partes por millón) en función del tiempo (min), para una toma de muestra cada 10 min y durante 120 min. A: negativas; B: positivas..... | 91 |
| Figura 24: Esquema de intervención para valorar la terapia combinada. Grupos y subgrupos, tratamientos antiparasitarios y fundamentos de la terapia dietético-nutricional..... | 94 |
| Figura 25: Prevalencia de parasitación por especie y grupo de estudio. Los datos significativos respecto al control se indican con asteriscos (*) ($p < 0,05$)..... | 106 |
| Figura 26: Frecuencia de sujetos con déficit de vitamina A respecto al rango de referencia en función del grupo o subgrupo de estudio..... | 114 |
| Figura 27: Valores de vitamina A individuales por grupo y subgrupo. Rango de referencia líneas verdes en eje de ordenadas..... | 115 |

| | |
|--|-----|
| Figura 28: Valores de vitamina A para pacientes del subgrupo A parasitados (rojo) y no parasitados (negro). Rango de referencia líneas verdes en eje de ordenadas..... | 116 |
| Figura 29: Frecuencia de sujetos del subgrupo A con déficit de vitamina A respecto a los rangos de referencia según si están parasitados o no y según especie..... | 117 |
| Figura 30: Valores de vitamina D individuales por grupo y subgrupo. Rango de referencia líneas verdes en eje de ordenadas..... | 118 |
| Figura 31: Análisis de la probabilidad de presentar malabsorción en asociación a las parasitosis intestinales..... | 126 |
| Figura 32: Análisis de la probabilidad de presentar malabsorción a fructosa en asociación a las parasitosis intestinales..... | 127 |
| Figura 33: Análisis de la probabilidad de presentar malabsorción a lactosa en asociación a las parasitosis intestinales..... | 129 |
| Figura 34: Ejemplo de material dietético con etiquetas y diario recibido del paciente en el que se registran sus ingestas, síntomas post ingesta y los ingredientes de los productos envasados..... | 133 |
| Figura 35: Representación gráfica en los tiempos pre y post de los valores de hidrógeno generales en los individuos revaluados..... | 139 |
| Figura 36: Representación gráfica en los tiempos pre y post de los pacientes parasitados y no parasitados revaluados..... | 140 |
| Figura 37: Representación gráfica de la comparación de las pendientes del total de las pruebas en tiempos pre y post tras aplicar la terapia combinada..... | 141 |
| Figura 38: Representación de la pendiente de los valores de hidrógeno en los tiempos pre y post del los pacientes con malabsorción a lactosa..... | 142 |

TABLAS:

| | |
|--|----|
| Tabla 1: Resumen de casos de cryptosporidiosis y giardiosis por Comunidades Autónomas entre el 2 de enero y el 31 de diciembre del 2017. Red Nacional de Epidemiología. Centro Nacional de Epidemiología..... | 31 |
| Tabla 2: Genotipos y subtipos de <i>G. intestinalis</i> aislados en humanos y animales..... | 43 |

| | |
|---|-----|
| Tabla 3: Genotipos de riesgo para los 5 SNPs del gen <i>MCM6</i> asociados a la hipolactasia..... | 63 |
| Tabla 4: Mutaciones genéticas más comunes en el gen <i>ALDOB</i> asociadas con la fructosemia o intolerancia hereditaria a la fructosa..... | 65 |
| Tabla 5: Variables analizadas en muestras sanguíneas..... | 89 |
| Tabla 6: Tratamientos antiparasitarios recomendados por <i>The Medical Letter</i> | 96 |
| Tabla 7: Características de los pacientes al ingreso en el estudio..... | 102 |
| Tabla 8: Prevalencia de parasitosis por especie parásita y grupo de estudio..... | 105 |
| Tabla 9: Métodos diagnósticos empleados combinados para <i>G. intestinalis</i> | 107 |
| Tabla 10: Comparación de resultados con ELISA indirecto y qPCR..... | 109 |
| Tabla 11: Valores descriptivos de vitaminas y minerales para pacientes y controles..... | 111 |
| Tabla 12: Valores descriptivos de vitaminas y minerales para los subgrupos de estudio..... | 113 |
| Tabla 13: Valores de media y de mediana de anticuerpos y proteínas de fase aguda obtenidos para pacientes e individuos sanos..... | 120 |
| Tabla 14: Valores de media y de mediana de células de la serie blanca para pacientes e individuos sanos..... | 121 |
| Tabla 15: Valores descriptivos de albumina y marcadores de anemia para los subgrupos de estudio..... | 122 |
| Tabla 16: Frecuencia de asociación entre parasitosis y los potenciales factores de riesgo..... | 124 |
| Tabla 17: Características de los pacientes revaluados tras la intervención terapéutica..... | 136 |
| Tabla 18: Porcentajes y número de casos de mejoría total en pacientes revaluados de malabsorción a lactosa y/o fructosa, parasitados y no parasitados..... | 138 |
| Tabla 19: Distribución de casos según los niveles de malabsorción en la prueba inicial y final para parasitados y no parasitados | 138 |

ÍNDICE

CAPÍTULO PRIMERO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUCCIÓN | 26 |
| 1.1 PARASITOSIS INTESTINALES..... | 28 |
| 1.1.1 Prevalencia a nivel mundial de las parasitosis intestinales..... | 28 |
| 1.1.2 Prevalencia en España de las parasitosis intestinales..... | 30 |
| 1.1.3 Fisiopatología de las parasitosis intestinales..... | 32 |
| 1.2 <i>GIARDIA INTESTINALIS</i> | 34 |
| 1.2.1 Ciclo biológico y formas de vida..... | 34 |
| 1.2.2 Epidemiología de la giardiosis..... | 39 |
| 1.2.3 Patología de la giardiosis..... | 44 |
| 1.2.4 Diagnóstico de la giardiosis..... | 49 |
| 1.3 <i>BLASTOCYSTIS SP.</i> | 54 |
| 1.3.1 Ciclo biológico y formas de vida..... | 54 |
| 1.3.2 Epidemiología de la blastocistosis..... | 55 |
| 1.3.3 Patología de la blastocistosis..... | 57 |
| 1.3.4 Diagnóstico de la blastocistosis..... | 58 |
| 1.4 OTROS PARÁSITOS INTESTINALES..... | 58 |
| 1.5 DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO..... | 59 |
| 1.5.1 Lactosa..... | 62 |
| 1.5.2 Fructosa..... | 64 |

CAPÍTULO SEGUNDO

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| 2 OBJETIVOS DEL ESTUDIO | 68 |
|--------------------------------------|-----------|

CAPÍTULO TERCERO

| | |
|---|-----------|
| 3 MATERIAL Y MÉTODOS | 72 |
| 3.1 MATERIAL..... | 74 |
| 3.1.1 Sujetos de estudio..... | 74 |
| 3.1.2 Muestras biológicas..... | 76 |
| 3.1.3 Material parasitológico..... | 77 |
| 3.2 MÉTODOS..... | 77 |
| 3.2.1 Diseño experimental e intervención terapéutica..... | 77 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.2.2 | Análisis parasitológico de muestras fecales..... | 80 |
| 3.2.2.1 | Inmunocromatografía..... | 80 |
| 3.2.2.2 | Examen microscópico..... | 83 |
| 3.2.2.3 | Ziehl-Neelsen modificado..... | 84 |
| 3.2.2.4 | PCR a tiempo real para el diagnóstico de <i>G. intestinalis</i> .. | 85 |
| 3.2.3 | Detección de IgA anti- <i>Giardia</i> en muestras de saliva..... | 87 |
| 3.2.4 | Análisis sanguíneo..... | 88 |
| 3.2.5 | Prueba del aliento o test del aire espirado..... | 89 |
| 3.2.5.1 | Procedimiento técnico del test | 90 |
| 3.2.5.2 | Dieta sin carbohidratos o “Dieta del día antes”..... | 92 |
| 3.2.6 | Terapia combinada..... | 93 |
| 3.2.6.1 | Manejo dietético-nutricional de la malabsorción..... | 94 |
| 3.2.6.2 | Tratamientos antiparasitarios..... | 96 |
| 3.2.7 | Consideraciones éticas..... | 97 |
| 3.2.8 | Métodos estadísticos..... | 97 |

CAPÍTULO CUARTO

| | | |
|----------|--|------------|
| 4 | RESULTADOS..... | 100 |
| 4.1 | CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO..... | 102 |
| 4.2 | PREVALENCIA DE PARASITACIÓN Y ESPECTRO PARASITARIO..... | 103 |
| 4.2.1 | Prevalencia de parasitación en función del sexo, la edad y el grupo de estudio..... | 104 |
| 4.2.2 | Métodos diagnósticos para <i>G. intestinalis</i> | 107 |
| 4.3 | ALTERACIONES ANALÍTICAS EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO.. | 109 |
| 4.3.1 | Marcadores de absorción intestinal. Vitaminas y minerales.... | 110 |
| 4.3.1.1 | Vitamina A..... | 114 |
| 4.3.1.2 | Vitamina D..... | 118 |
| 4.3.1.3 | Vitamina E..... | 119 |
| 4.3.2 | Marcadores de Infección/Inflamación..... | 119 |
| 4.3.3 | Otros marcadores analizados..... | 122 |
| 4.4 | FACTORES DE RIESGO DE PARASITOSIS INTESTINAL..... | 123 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.5 | ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN PARÁSITOS–MALABSORCIÓN..... | 125 |
| 4.5.1 | Asociación presencia de parásitos y estado de malabsorción..... | 126 |
| 4.5.2 | Asociación presencia de parásitos y malabsorción a fructosa.... | 127 |
| 4.5.3 | Asociación presencia de parásitos y malabsorción a lactosa..... | 128 |
| 4.6 | VALORACIÓN DE LA EFICACIA DE LA TERAPIA COMBINADA... | 130 |
| 4.6.1 | Valoración de la eficacia del tratamiento farmacológico..... | 130 |
| 4.6.2 | Valoración de la eficacia del manejo dietético-nutricional..... | 131 |
| 4.6.3 | Descripción de la muestra revaluada tras la terapia..... | 135 |
| 4.6.4 | Comparación de los test de aliento iniciales y finales..... | 137 |

CAPÍTULO QUINTO

| | | |
|----------|--|------------|
| 5 | DISCUSIÓN..... | 144 |
| 5.1 | PREVALENCIA DE PARASITACIÓN Y ESPECTRO PARASITARIO... | 146 |
| 5.2 | MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA <i>G. intestinalis</i> | 149 |
| 5.3 | ALTERACIONES ANALÍTICAS EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO.. | 152 |
| 5.4 | FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LAS PARASITOSIS..... | 155 |
| 5.5 | ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN PARÁSITOS Y MALABSORCIÓN... | 157 |
| 5.6 | VALORACIÓN DE LA EFICACIA DE LA TERAPIA COMBINADA... | 159 |

CAPÍTULO SEXTO

| | | |
|----------|--------------------------|------------|
| 6 | CONCLUSIONES..... | 164 |
|----------|--------------------------|------------|

| | | |
|--|--|------------|
| | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 168 |
|--|--|------------|

| | | |
|--|--------------------|------------|
| | ANEXOS..... | 196 |
|--|--------------------|------------|

| | | |
|--|---|-----|
| | Anexo I - Consentimiento informado..... | 198 |
|--|---|-----|

| | | |
|--|---|-----|
| | Anexo II - Cuestionario para la toma de datos del paciente..... | 199 |
|--|---|-----|

| | | |
|--|--|-----|
| | Anexo III - “Dieta del día de antes..... | 200 |
|--|--|-----|

| | | |
|--|---|-----|
| | Anexo IV - Aprobación del estudio por CEIB (IISLAFE). Fase I..... | 201 |
|--|---|-----|

| | | |
|--|---|-----|
| | Anexo V - Aprobación del estudio por CEIB (IISLAFE). Fase II..... | 202 |
|--|---|-----|

CAPÍTULO PRIMERO

INTRODUCCIÓN

1.1 PARASITOSIS INTESTINALES

Las enfermedades parasitarias tienen un gran impacto en la salud humana y animal. Entre ellas, las parasitosis intestinales afectan a una gran proporción de la población mundial, tanto en zonas rurales, como en zonas urbanas (Naghari *et al.*, 2017; Vos *et al.*, 2017). Estas infecciones son generalmente subestimadas en población adulta, por cursar en la mayoría de los casos de forma asintomática, pero sin embargo representan un factor de morbilidad importante por su carácter debilitante e incapacitante (Solano *et al.*, 2008).

1.1.1 PREVALENCIA A NIVEL MUNDIAL DE LAS PARASITOSIS INTESTINALES

Las parasitosis intestinales afectan a cualquier grupo de edad, no obstante, la prevalencia es mayor en los niños. La población infantil, es especialmente susceptible a padecer enteroparasitosis y a desarrollar sintomatologías agudas; en cuanto a las personas adultas, la levedad o la falta de especificidad de los síntomas, pueden propiciar la cronicidad de dichas infecciones (Solano *et al.*, 2008). La Organización Mundial de la Salud (OMS), afirma que más de la quinta parte de la población mundial está infectada por uno o varios parásitos intestinales, llegando incluso a alcanzar al 45% de la población en zonas de África, Sudamérica y América Central.

La falta de herramientas de diagnóstico adecuadas para muchas de estas enfermedades hace que la investigación sobre nuevos tipos de dispositivos de detección sea una necesidad. Las parasitosis de origen zoonótico son una de las causas de pérdidas económicas sustantivas en las poblaciones ganaderas, por ello ha crecido el interés en los últimos años en comprender la transmisión de enfermedades entre animales silvestres y domésticos, y entre ellos y la población humana, lo que ha dado lugar a la aparición del "enfoque de salud único", que tiene como objetivo modelar la transmisión de enfermedades parasitarias, la detección y el control de la transmisión. Además, el diagnóstico rápido de muchas enfermedades parasitarias complejas con

tratamientos a tiempo y medidas de control específicas son esenciales para evitar los efectos secundarios que éstas generan, las comorbilidades y las pérdidas económicas (Sánchez-Ovejero *et al.*, 2016). Cada vez son más frecuentes las infecciones de origen alimentario o zoonosis alimentarias constituyendo una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. La intensa actividad comercial y la movilización de las personas, animales, sus productos y subproductos, así como los cambios sociales y demográficos propician un nuevo periodo de enfermedades emergentes y reemergentes que intensifica la importancia de adquirir y difundir el conocimiento existente acerca de las zoonosis (OMS, 2013).

En la década de los 60s, la mayoría de las enfermedades transmitidas por los alimentos estaban relacionadas con agentes etiológicos víricos o bacterianos (*Salmonella* spp., *Clostridium botulinum* y *Staphylococcus aureus*), pero en los últimos años, están recibiendo más atención los casos de zoonosis parasitarias ya que en estudios recientes se ha visto que las infecciones transmitidas por los alimentos; como es el caso de la toxoplasmosis, la giardiosis o la cisticercosis, afectan a millones de personas en todo el mundo (Macpherson *et al.*, 2000). Concretamente, la giardiosis y la criptosporidiosis son dos de las protozoosis intestinales más frecuentes causantes de infecciones gastrointestinales en Europa (EFSA, 2011; Cacciò & Chalmers, 2016; Horton *et al.*, 2018).

Giardia intestinalis es, en la actualidad, el protozoo intestinal más prevalente del mundo. Los primeros brotes registrados por consumo de agua contaminada datan ya de los años 60 en Estados Unidos (Vázquez & Campos, 2009). Su prevalencia varía según el país en el que nos fijemos: los países industrializados muestran entre un 2 y un 7 %, mientras que en países empobrecidos se alcanza hasta un 30%. Asimismo, cabe destacar que es el patógeno responsable del 25 % de las enfermedades gastrointestinales que se registran (Odoi *et al.*, 2004; Cordero *et al.*, 2014).

1.1.2 PREVALENCIA EN ESPAÑA DE LAS PARASITOSIS INTESTINALES

Según datos aportados por el Sistema de Información Microbiológica (SIM) del Instituto de Salud Carlos III, entre los principales agentes infecciosos reportados en pacientes del país encontramos a los parásitos intestinales. Asimismo, en los últimos años se ha observado una tendencia al alza en el número de brotes alimentarios por microorganismos patógenos, entre los que se describen casos de parasitosis (Fos *et al.*, 2000). En el año 1999, este organismo público 213 casos de *Blastocystis* sp., 97 casos de *Cryptosporidium* spp. y 523 casos de *G. intestinalis*. Entre los parásitos declarados a nivel nacional, los parásitos más frecuentes, en orden decreciente fueron: *G. intestinalis*, *Enterobius vermicularis*, *Blastocystis* sp., *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* spp. y *Taenia solium*.

Los datos que proporciona el SIM como tal, pueden resultar muy útiles como punto de partida en la identificación de los principales agentes etiológicos, detección de brotes epidémicos y en la identificación de nuevos agentes y patologías emergentes, sin embargo, tiene sus limitaciones. No todas las parasitosis son enfermedades de declaración obligatoria, y no todos los laboratorios de análisis comunican sus diagnósticos, por tanto, lo que refleja este boletín podría no ser real y estar infravalorado. Este mismo organismo aporta el resumen de datos declarados por Comunidad Autónoma. En la Tabla 1 se pueden consultar los datos para el año 2017, en el cual se registraron 556 casos de *Cryptosporidium* spp. siendo el País Vasco, la comunidad española con mayor prevalencia (207 casos).

En cuanto a la giardiosis, la Comunidad Autónoma con mayor número de casos declarados fue Cataluña con 652 casos, seguida por el País Vasco con 492 casos. Se declararon un total de 2.917 casos, una cifra muy por encima de la de *Cryptosporidium* spp.

Tabla 1: Resumen de casos de cryptosporidiosis y giardiosis por Comunidades Autónomas (Entre el 2 de enero y el 31 de diciembre del 2017. Red Nacional de Epidemiología. Centro Nacional de Epidemiología).

| COMUNIDAD AUTÓNOMA | cryptosporidiosis | giardiosis |
|-----------------------------|--------------------------|-------------------|
| <i>Andalucía</i> | 6 | 97 |
| <i>Aragón</i> | 12 | 117 |
| <i>Asturias</i> | - | - |
| <i>Baleares</i> | - | - |
| <i>Canarias</i> | 25 | 199 |
| <i>Cantabria</i> | | 30 |
| <i>Castilla y León</i> | 10 | 125 |
| <i>Castilla La Mancha</i> | 3 | 102 |
| <i>Cataluña</i> | 68 | 652 |
| <i>Comunidad Valenciana</i> | 75 | 457 |
| <i>Extremadura</i> | 3 | 50 |
| <i>Galicia</i> | - | - |
| <i>Madrid</i> | 81 | 398 |
| <i>Murcia</i> | - | - |
| <i>Navarra</i> | 57 | 194 |
| <i>País Vasco</i> | 207 | 492 |
| <i>Rioja (La)</i> | 8 | - |
| <i>Ceuta</i> | 1 | 2 |
| <i>Melilla</i> | - | - |
| <i>Extracomunitarios</i> | 0 | 2 |
| <i>Total País</i> | 556 | 2.917 |

Más allá de la información proporcionada por el SIM, existen algunos estudios sobre la prevalencia española de parasitosis intestinales en población infantil, coincidiendo la mayoría en que el 89% de las parasitosis son producidas por parásitos unicelulares en el siguiente orden de frecuencia: *Blastocystis* sp., *G. intestinalis*, *Entamoeba coli* y *Endolimax nana* (Lara *et al.*, 2010). Otros estudios presentan a *G. intestinalis* y *Cryptosporidium* spp. como los más frecuentes en edades inferiores a 5 años (López &

Pérez, 2011). Lara y colaboradores en 2010 analizaron los parásitos intestinales en muestras fecales de niños escolarizados en 2º ciclo de Educación Infantil y Primaria de la ciudad de Valencia; en total fueron 1.031 participantes y se obtuvieron 32 aislamientos de *G. intestinalis*, es decir, una prevalencia del 6,1 %.

1.1.3 FISIOPATOLOGÍA DE LAS PARASITOSIS INTESTINALES

En estos últimos años han aumentado las investigaciones sobre el papel de los parásitos intestinales en la etiología de los trastornos digestivos funcionales caracterizados por molestias abdominales en respuesta a estímulos luminales, exposición antigénica (agentes infecciosos o alimentos) o psicossomáticos. Asimismo, y de forma concreta, algunos estudios empiezan a relacionar positivamente a las parasitosis intestinales producidas por organismos unicelulares con dispepsias funcionales, síndromes de malabsorción y el síndrome de intestino irritable (SII) (Moya-Camarena *et al.*, 2002; Yakoob *et al.*, 2005; Grazioli *et al.*, 2006; Stark *et al.*, 2006; Abulhasan *et al.*, 2013; Fouad *et al.*, 2014; Cifre *et al.*, 2018), patologías cada vez más prevalentes en nuestra sociedad.

De forma general, las parasitosis intestinales se suelen acompañar de una inflamación intestinal asociada con un aumento de la apoptosis de los enterocitos, una renovación celular acelerada, un transporte anormal de los electrolitos, una pérdida de la función barrera (afectación de las uniones estrechas) y, de forma secundaria, la penetración de bacterias comensales. Estos serían los principales mecanismos propuestos como responsables del daño causado por dichos parásitos, los cuales llevarían asociados cuadros de mala digestión y malabsorción, más o menos generalizados en función de la porción intestinal afectada. Estas infecciones podrían cursar de forma crónica por diversos motivos y, con ello, se agravarían los efectos a nivel inmunológico y nutricional (Troeger *et al.*, 2007; Cotton *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2013; Halliez & Buret, 2013; Bartelt & Sartor, 2015; Ögren *et al.*, 2016; Fink & Singer, 2017).

El protozoo intestinal patógeno más estudiado en relación con este tipo de patologías es *G. intestinalis*, ya que coloniza la parte alta intestinal y su interacción con el

hospedador, provoca un daño directo e indirecto sobre la mucosa, más concretamente sobre las vellosidades y microvellosidades, afectando a la absorción de los alimentos (Scott *et al.*, 2004; Buret, 2005). Otros parásitos intestinales también relacionados en la literatura con trastornos gastrointestinales son los parásitos unicelulares *Blastocystis* sp. y *Dientamoeba fragilis*, así como el helminto *Strongyloides stercoralis* (Stark *et al.*, 2007, 2010; Barrat *et al.*, 2011; Bisoffi *et al.*, 2013). Estas parasitosis adquiridas por adultos inmunocompetentes con frecuencia tienden a la cronicidad; las manifestaciones clínicas son poco aparentes y muchas veces el diagnóstico, o no se realiza, o no es el adecuado, quedando infradiagnosticadas, mientras tanto, estos individuos actuarán como portadores, siendo una fuente de infección para otros.

Es importante considerar que el “*gold standard*” para el diagnóstico de la mayoría de las infecciones parasitarias sigue siendo la microscopía convencional, que presenta importantes limitaciones en términos de sensibilidad y especificidad y, por lo general, requiere técnicos altamente capacitados. Es necesario implementar herramientas de diagnóstico de base molecular más precisas para la detección temprana, tratamientos efectivos y exámenes masivos con capacidades de alto rendimiento (Sánchez-Ovejero *et al.*, 2016; Formenti *et al.*, 2017). Además de perseguir la optimización de las técnicas diagnósticas, en el caso concreto de las parasitosis por sus mecanismos inmunomoduladores y sus ciclos de vida complejos, sería recomendable considerar el combinar diferentes técnicas parasitológicas, directas e indirectas para tratar de aumentar la eficacia del diagnóstico (Stark *et al.*, 2007; Koehler *et al.*, 2013).

1.2 *GIARDIA INTESTINALIS*

Giardia intestinalis (sinónimo de *G. lamblia* y *G. duodenalis*), es un protozoo flagelado intestinal con un amplio espectro de especies animales como hospedador tales como aves, reptiles, anfibios y mamíferos, incluido el ser humano. Es un parásito cosmopolita y se le considera uno de los protozoos patógeno más común siendo la principal causa de gastroenteritis y diarrea de origen parasitario (CDC, 2017).

Este parásito unicelular fue observado en 1681 por primera vez por Antony van Leeuwenhoek (el inventor del microscopio, en sus propias heces), y fue descrito más tarde por Lambl en 1859 quien lo llamó “*Cercomonas intestinalis*”. Más tarde, se le asignó el nombre genérico de *intestinalis* por Blanchard en 1888, y el nombre de *Giardia intestinalis* fue aceptado internacionalmente en 1970 (Fonte & Almannoni, 2009). Se conocen alrededor de 80 organismos con una morfología similar a *G. intestinalis* que infectan a más de 40 especies de animales. El género en el que se encuadra esta especie incluye otras como *Giardia agilis* de anfibios, *Giardia muris* de roedores y pájaros, considerados como posibles agentes etiológicos de la infección zoonótica por parte de la (OMS, 2015).

1.2.1 CICLO BIOLÓGICO Y FORMAS DE VIDA

La transmisión de *G. intestinalis* es fecal-oral y se produce de forma indirecta a través de la ingesta de agua o alimentos contaminados con quistes del parásito o directamente por manos o fómites contaminados tras el contacto con personas o animales parasitados (Figura 1) (Xiao & Fayer, 2008; Feng & Xiao, 201; CDC 2017). *G. intestinalis* presenta durante su ciclo de vida dos formas morfológicas distintas: el trofozoíto o forma vegetativa (Figura 2a), cuyo hábitat natural es la pared del intestino delgado y es responsable de la enfermedad; y el quiste (Figura 2b) que es la forma de resistencia y responsable de la transmisión.

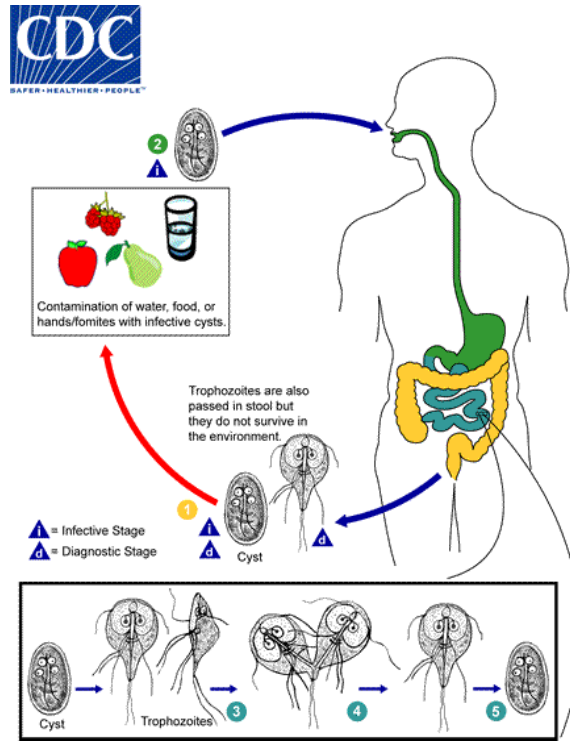


Figura 1. Ciclo de vida de *G. intestinalis* (CDC, 2017).

Los trofozoítos colonizan principalmente el duodeno y yeyuno, aunque algunos pueden parasitar el íleon, si bien algunas veces remontan las vías biliares e incluso el tubo pancreático, pudiendo ser la causa de colecistitis y pancreatitis (Soto & Dreiling, 1977; Halliez & Buret, 2013).

El desarrollo óptimo de los trofozoítos tiene lugar a un pH entre 6,4 y 7,2. Para que tenga lugar la proliferación se requiere una alta concentración de nutrientes, especialmente los que el parásito es incapaz de sintetizar *de novo* como el colesterol, los aminoácidos, las bases nitrogenadas, las purinas y las pirimidinas. El trofozoíto de *G. intestinalis* tiene dos núcleos iguales (Figura 2a) con un contenido igual de ADN; ambos poseen actividad transcripcional poseyendo un gran cariosoma central. *G. intestinalis* se multiplica asexualmente por división longitudinal binaria, la

cariocinesis se produce primero, seguida de la del disco adhesivo y posterior división citoplasmática, produciendo así dos trofozoítos (Figura 3).

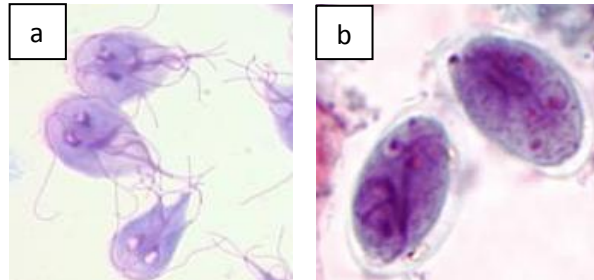


Figura 2. Formas de vida de *G. intestinalis* (CDC, 2017).

Los trofozoítos miden aproximadamente 10-12 μm de longitud, 5-9 μm de ancho y 1-2 μm de espesor. Vistos de frente tienen un contorno en forma de pera y simetría bilateral características que la distinguen de los demás protozoos que parasitan al humano (Figura 3).

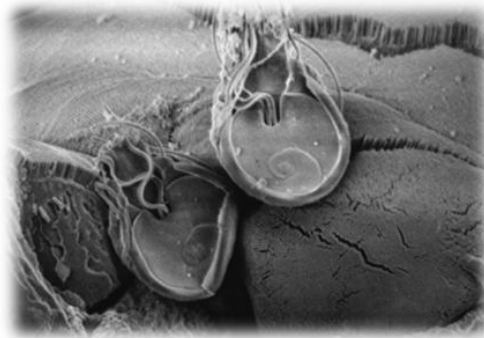


Figura 3. Trofozoíto de *G. intestinalis*, disco adhesivo y simetría bilateral por microscopía electrónica de barrido.

Fuente: <http://photos1.blogger.com/blogger/3913/3205/1600/Giardia.png>

En *G. intestinalis*, el citoesqueleto está formado por el disco adhesivo ventral, los denominados cuerpos medios y cuatro pares de flagelos (dos anterolaterales, dos posterolaterales, dos caudales y dos ventrales) (Figura 2a). El disco ventral es una estructura esencial formada por túbulos del citoesqueleto. Las secciones transversales del disco presentan una forma cóncava, y en los bordes, forman una cresta densa lateral o banda lateral y otra ventrolateral (Figura 4), las cuales resultan importantes en el proceso de adhesión, pudiéndose interdigitalizar entre las microvellosidades del intestino.

Los dos cuerpos medios son estructuras con forma de coma, situados en el centro de la línea del trofozoíto, transversalmente al eje de la célula. Esta estructura, esencialmente formada de microtúbulos, se ha utilizado como herramienta taxonómica para clasificar las especies de *Giardia* (Filice, 1952). Se han identificado proteínas concretas relacionadas con estas estructuras como la kinesina 13 (Dawson *et al.*, 2007), EB1, proteína asociada a los microtúbulos e implicada en la organización de los mismos (Kim *et al.*, 2009), β -giardina y proteínas involucradas en la contracción en respuesta al ion calcio. El papel funcional desempeñado por los cuerpos medios aún no se ha establecido, pero pudieran representar un sitio para la nucleación de los microtúbulos (Holberton & Ward, 1981).

El movimiento del protozoo está asociado con los flagelos participando tanto en la adhesión de los trofozoítos a la mucosa intestinal, como en la creación, con su movilidad, de una presión negativa que forzaría a los nutrientes hacia el interior del disco adherido a la mucosa. Los trofozoítos se alimentan por pinocitosis, vacuolas digestivas que se describen en la superficie dorsal.

El parásito no invade el epitelio intestinal del hospedador, pero su unión provoca cambios ultraestructurales en las células alterando la morfología de las microvellosidades. Otros orgánulos de células eucariotas, tales como mitocondrias o peroxisomas no han sido identificados en *Giardia*. El aparato de Golgi solo se hace visible en los trofozoítos durante el enquistamiento (Fonte & Almannoni, 2009).



Figura 4. Corte transversal del trofozoíto de *G. intestinalis*, disco adhesivo por microscopía electrónica de transmisión.

Fuente: Cortesía del Dr. Antonio Osuna,
Universidad de Granada.

Las proteínas de la superficie de *Giardia* han sido mencionadas como posibles factores implicados en la patogenicidad del parásito, en particular, las que producen las proteínas variables de la superficie o VSP (Variable Surface Protein) ricas en cisteína, la lectina GP-49 y algunas glicoproteínas (Gargantini *et al.*, 2016).

La forma de resistencia del protozoo en el medio ambiente y de difusión de la parasitosis al ser humano como forma infectante es el quiste. Éstos son extraordinariamente resistentes pudiendo sobrevivir en el medio externo durante meses en ambientes húmedos y fríos; resisten al cloro empleado para el tratamiento convencional de las aguas, pero son sensibles al calor y a la desecación. La dosis infectante para el ser humano es muy baja y se estima en torno a los 10 quistes (Betancourt & Rose, 2004; Carmena *et al.*, 2007). El quiste presenta una forma ovoide o elipsoide, cerca de 7-10 μm de longitud por 5-8 μm de ancho (Figura 4). La parte externa está formada por una capa fina, de 0,3 μm de espesor, compuesta por filamentos de 7-30 nm de ancho. Por debajo de la superficie filamentosa hay dos membranas separadas por el espacio periplásmico, adyacente a la pared. En el interior del quiste maduro se encuentran dos trofozoítos, observándose 4 núcleos. Los estudios

sobre la composición glucídica de la pared demostraron que la N-acetilgalactosamida (GalNAc) es el azúcar predominante (Chatterjee *et al.*, 2019).

1.2.2 EPIDEMIOLOGIA DE LA GIARDIOSIS

Se estima que alrededor de 280 millones de personas al año presentan diarrea aguda en todo el mundo causada por *G. intestinalis*. Este parásito, es el agente etiológico de la mayoría de los brotes de diarrea causados por aguas contaminadas, siendo por tanto el típico ejemplo de lo que se denomina “*Water-borne disease*” (Carmena *et al.*, 2007; Einarsson *et al.*, 2016; Horton *et al.*, 2018).

En los países industrializados, la incidencia de *G. intestinalis* se encuentra entre 2-7%, si bien estos datos se consideran subestimados; mientras en los países empobrecidos las tasas de infección pueden llegar al 50% de la población (Minetti *et al.*, 2015) comprometiendo el desarrollo y el crecimiento socioeconómico de estos países como una más de las enfermedades olvidadas “*Neglected Diseases*” junto con la criptosporidiosis desde 2004 (Savioli *et al.*, 2006). Son conocidas las epidemias de giardiosis producidas por contaminación de aguas de consumo humano, tanto en el Reino Unido como en Colorado (Estados Unidos), Canada y Noruega (Kent *et al.*, 1988; Nygard *et al.*, 2006; Karanis *et al.*, 2007; Baldlursson & Karanis, 2011; Horton *et al.*, 2018).

En un examen de los brotes humanos de las enfermedades transmitidas por el agua, entre los años 2004 y 2010, se indicó que *G. intestinalis* representó un 35% de estos brotes en los países de ingresos más altos. Este dato se ve respaldado por datos recientes de 2011 a 2016, donde se refleja que el 37% de los brotes mundiales de parásitos intestinales son debidos a este protozoo y que la mayoría de los datos de estos estudios fueron declarados por países de rentas altas, ya que los países de bajos ingresos a menudo carecen de los sistemas de vigilancia necesarios. De momento, la carga real de brotes de transmisión por el agua de *Giardia* seguirá siendo desconocida hasta que se apliquen programas de vigilancia a nivel mundial. Así mismo, la transmisión alimentaria de *G. intestinalis* también está siendo reportada, debido al

lavado o manipulación inadecuada de productos vegetales (Amorós *et al.*, 2010; Horton *et al.*, 2018; Ryan *et al.*, 2018).

La giardiosis presenta un amplio espectro clínico que va desde la infección asintomática hasta la posibilidad de un curso grave con pérdidas de peso importantes y cuadros de malabsorción. Hoy en día, todavía no existe una explicación satisfactoria para la diversidad de síntomas y signos asociados a la giardiosis. Sin embargo, se ha demostrado una alta diversidad en las características genotípicas y fenotípicas de los aislados de *G. intestinalis*, y existen estudios que tratan de relacionar estas diferencias en los genotipos y subtipos con los efectos patológicos inducidos en el hospedador, en relación con la virulencia del parásito, la microbiota, las co-infecciones, la respuesta inmunitaria del hospedador y la susceptibilidad del protozoo al fármaco de elección (Figura 5) (Fouad *et al.*, 2014; Bartelt *et al.*, 2015; Azcona-Gutiérrez *et al.*, 2017).

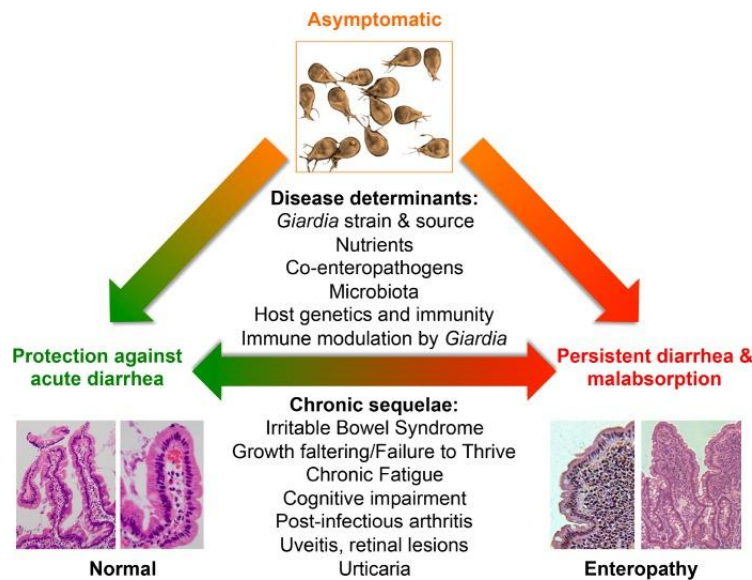


Figura 5: Determinantes y mecanismos de la evolución clínica de la giardiosis. Desde los casos asintomáticos, la protección frente a la diarrea aguda, a la diarrea persistente y los síndromes de malabsorción (Bartelt *et al.*, 2015).

Estudios recientes basados en el análisis de las secuencias del ARN ribosómico, y en la comparación de diferentes familias de genes, demuestran la escasa presencia de intrones en su ADN, lo que junto con la falta de reproducción sexual y la ausencia de mitocondrias en su citoplasma hace pensar en un organismo de características muy primitivas, en posición basal de la filogenia molecular (Sugaya & Otsuka, 2002; Kolisko *et al.*, 2005; Morrison *et al.*, 2007), por tanto, un organismo separado, al igual que el resto de los diplomonadidos, de los restantes flagelados. Algunos estudios llegan un poco más lejos, y colocan a *Giardia* como ejemplo de la aparición de la reproducción sexual en la naturaleza, a causa de la presencia de los dos núcleos, los cuales tienen además otra función de resistencia a las condiciones adversas y hace posible que se catalogue a *Giardia* como un posible eslabón perdido de la reproducción sexual (Acha & Szytres 2003; Luján, & Svärd, 2011). Así, además de la importancia de *Giardia* como patógeno, el protozoo es bastante atractivo para los biólogos celulares y evolucionistas ya que se podría considerar un protista muy primitivo, casi en el borde de la aparición de las células eucariotas.

La clasificación molecular ha sido de gran valor en la comprensión de la diversidad de *Giardia*, tanto de origen humano como animal. Como se ha mencionado, *G. intestinalis* se encuentran en una gran variedad de mamíferos, además del ser humano. Aunque presentan similitudes morfológicas, el análisis genético de 200 cepas humanas y de 50 aislados animales reveló un sorprendente grado de heterogeneidad genética (Feng & Xiao, 2011).

La caracterización de diferentes aislados de *Giardia* realizados por análisis de los polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP) permitieron la descripción de tres grupos. El grupo 3 era tan diferente de los grupos 1 y 2 que se sugirió la creación de una especie nueva, dado que las diferencias eran incluso mayores que las existentes entre especies de otros protozoos. Posteriores estudios se basaron en análisis de zimodemas y RFLP, así como en estudios cromosómicos mediante electroforesis de campo pulsado (PFGE). Actualmente, estos estudios son considerados de valor limitado para los estudios taxonómicos ya que se producen con frecuencia

reordenamientos cromosómicos. Del mismo modo, la clasificación realizada en base a los antígenos de superficie también se consideró de escaso valor, dada la variación antigénica en las proteínas de superficie (VSP) que existe en *Giardia*, un mecanismo de evasión que utiliza el parásito para escapar del sistema inmunitario del hospedador.

Actualmente el genotipado de los aislados de *Giardia* se realiza mediante tipado multilocus de secuencias (MLST), amplificando específicamente los genes del parásito que codifican las proteínas glutamato deshidrogenasa (gdh), triosa fosfato isomerasa (tpi) y β -giardina (bg) (Read *et al.*, 2004; Lalle *et al.*, 2005; de Lucio *et al.*, 2015; Flecha *et al.*, 2015; Azcona-Gutiérrez *et al.*, 2017). Los análisis de MLST están especialmente recomendados en estudios moleculares poblacionales debido a su capacidad discriminadora a nivel de secuencias nucleotídicas, así como para la identificación de infecciones mixtas de varios genotipos del parásito. Dichos genotipados son necesarios a fin de poder correlacionar el genotipo con los estudios epidemiológicos que aclaran del origen de la infección, así como para estudios de virulencia o incluso de resistencia a los tratamientos convencionales. En base a estos estudios se dividen las cepas humanas de *G. intestinalis* en dos principales grupos genéticos A y B. Estos dos grupos poseen una alta heterogeneidad genética dentro de cada uno de ellos (Tabla 2). Los aislados de *G. intestinalis* pertenecientes a estos dos grupos se distribuyen en todo el mundo, aunque los del grupo B parecen limitarse a focos endémicos aislados.

Los aislados en humanos se clasifican dentro del genotipo A, en los subtipos I y II. Las cepas del genotipo I (AI) son esencialmente monomórficas habiendo sido aislados tanto del ser humano, como de animales domésticos (perros, gatos, castores, cobayas, caballo, cerdo, cabra y vaca) (Tabla 2) y constituyen cepas zoonóticas con distribución mundial. El genotipo II (AII) sólo se ha encontrado en los seres humanos, mientras que el genotipo III (subtipo BIII), responsable de aproximadamente el 60% de las infecciones humanas en el mundo (Ryan & Cacció, 2013), se distribuye a través de una amplia variedad de hospedadores, sobre todo en seres humanos, perro, castor,

roedores y chinchilla (Tabla 2). Los aislados del genotipo B mostraron una mayor heterogeneidad genética que la observada en los aislados del genotipo A.

Tabla 2. Genotipos y subtipos de *G. intestinalis* aislados de seres humanos y animales.

| Designación propuesta | Grupo Nash ^a | Grupo Mayrhofer ^b | Clasificación de Homan ^c | Hospedadores ^d |
|-------------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------------------|--|
| Genotipo AI | 1 | A (grupo 1) | “Polish” | Humano , castor, gato, lemúridos, caprinos, cánidos, chinchillas, équidos, cerdo, bóvidos |
| Genotipo AII | 2 | A (grupo 2) | | Humano |
| Genotipo B (BIII y BIV) | 3 | B (grupo 3 y 4) | “Belgian” | Humano , castor, perro, monos, cobaya |
| Genotipo | | C | | Cánidos |
| Genotipo | | D | | Cánidos |
| Genotipo | | E | | Bovino, caprino, alpaca, cerdos |
| Genotipo | | F | | Gato |
| Genotipo | | G | | Ratas |
| Genotipo | | H | | Mamíferos marinos |

^aNash *et al.*, (1985); ^bMayrhofer *et al.*, (1995); ^cHoman *et al.*, (1991); ^dFeng & Xiao (2011)

En el caso de *G. intestinalis*, se encontró que los aislados del genotipo A eran más frecuentes en individuos infectados asintomáticos, mientras que los aislados del genotipo B se encontraban más frecuentemente en sujetos infectados con diarrea persistente. Por el contrario, en encuestas realizadas de forma sistemática en Australia, Bangladesh, Portugal, España y Turquía, y otros estudios realizados en Brasil, India e Irán, se obtuvieron datos no concluyentes o no hubo correlación entre genotipos y síntomas. Información previa sobre poblaciones pediátricas españolas ha demostrado que, en pacientes menores de 5 años de edad, la giardiosis sintomática estuvo presente en el 81,2% de las infecciones del subtipo AII, pero sólo en el 34,6% de los casos del genotipo B. En otro estudio, el genotipo B fue el aislado más frecuente en niños

aparentemente sanos de 1 a 12 años (57,1%) (Mateo *et al.*, 2014). En el estudio más reciente de genotipado de *Giardia* realizado en España en 2017 por Azcona-Gutiérrez y colaboradores sobre individuos sintomáticos resultó que, el subtipo más frecuente entre la población analizada fue el AII (44%), seguido del BIV (33%) y el BIII (19%).

Se han propuesto otros grupos adicionales para *Giardia* procedentes de aislados de otros mamíferos, si bien son morfológicamente similares a los aislados de *G. intestinalis*. De hecho, un estudio secuencial de once aislados de perro han permitido identificar dos nuevos genotipos genéticos (C y D) diferentes de los genotipos A y B (Tabla 2); y basándose en estudios por PCR de nueve aislados de heces de perro, donde sólo se encuentre un aislado similar a las cepas humanas, lo que sugiere que la mayoría de las cepas que infectan el perro son genéticamente distintas de las que se encuentran en el ser humano. Otros genotipos separados (E-G) se han creado para la *Giardia* aislada del ganado bovino, gato y ratón (Tabla 2). Los genotipos de perro, gato, ratón doméstico y ratón de campo son muy diferentes del genotipo A y B. En definitiva, la giardiosis puede ser considerada una zoonosis, casi exclusivamente limitada a los genotipos A y B de *G. intestinalis*, lo que explicaría en gran medida las epidemias recientes generadas tanto en Estados Unidos y Reino Unido, y el aumento de casos que se observan en ciudades de países desarrollados al convivir de manera estrecha los seres humanos con sus mascotas (Kotton *et al.*, 2010, 2017).

1.2.3 PATOLOGÍA DE LA GIARDIOSIS

El espectro clínico de la giardiosis en los seres humanos es muy amplio, desde casos asintomáticos, a diarrea aguda, pasando por síndromes de malabsorción de carbohidratos (lactosa, sacarosa, fructosa...) (Vega-Franco *et al.*, 1987; Pettoello *et al.*, 1989; Grazioli *et al.*, 2006), malabsorción de lípidos y vitamina B12 (Cordingley & Crawford, 1986; Moya-Camarena *et al.*, 2002), lo que conllevaría a una pérdida aguda de peso y comprometería el crecimiento y desarrollo intelectual en población infantil. Los mecanismos responsables de los síntomas clínicos observados en la giardiosis humana no se conocen por completo (Figura 6). Se sugirió inicialmente que

la barrera mecánica producida por la adhesión de los trofozoítos en el epitelio intestinal y la competencia en la absorción de nutrientes entre el parásito y el hospedador serían los responsables de la diarrea y la malabsorción (Alparo, 2005).

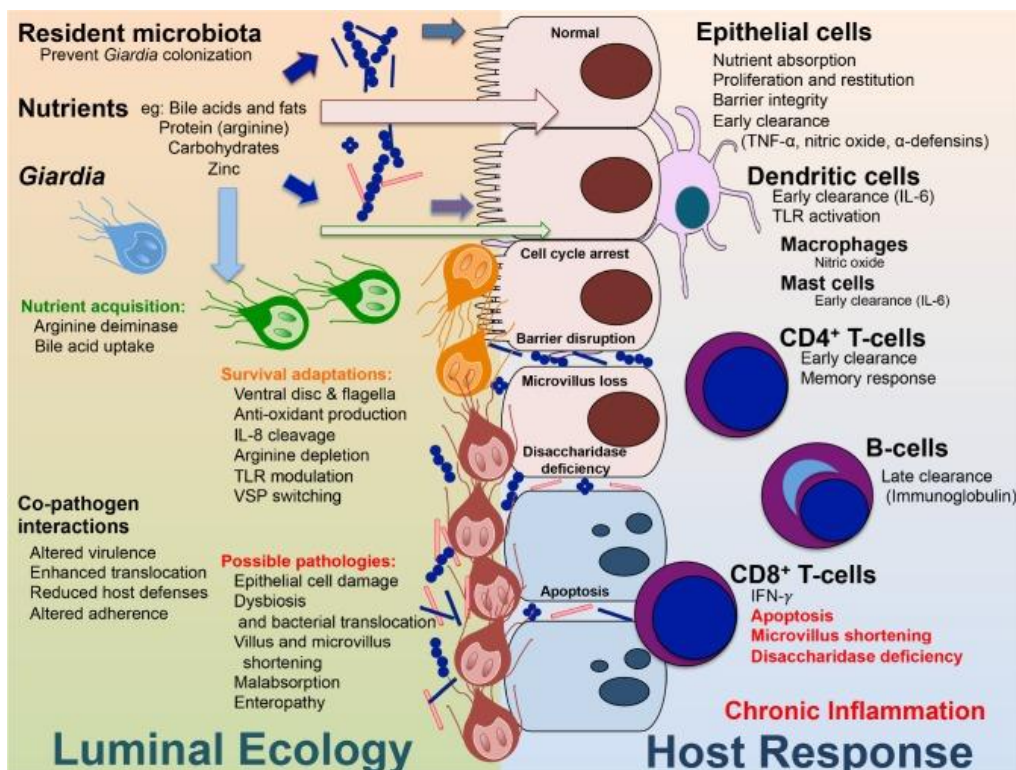


Figura 6: Factores determinantes de la capacidad de infección de *G. intestinalis*. Microbiota intestinal, cepa del parásito, co-enteropatógenos y respuesta inmunitaria del hospedador (Bartelt *et al.*, 2015).

La patogénesis parece ser multifactorial y depende de los siguientes factores: capacidad del parásito de causar daño directo a la mucosa intestinal a través de su adhesión; la presencia en el disco ventral de lectinas asociadas con un aumento de la muerte celular; la reducción de la capacidad de absorción de las zonas con las lesiones; la inhibición de las disacaridasas; la acción de las cistein-proteasas del parásito; la estimulación de la respuesta inmunitaria con la liberación de citoquinas y la inflamación de la mucosa con aumento del número de linfocitos intraepiteliales. Por

otro lado, los trofozoítos de *Giardia* captan las sales biliares y los ácidos grasos, un proceso que probablemente interfiere con la solubilización micelar de las grasas que conduce a la esteatorrea característica de la enfermedad (Halliday *et al.*, 1988; Farthing, 1996). Junto con los mecanismos anteriores, la giardiosis se asocia con un repertorio completo de cambios en la arquitectura de las vellosidades por la atrofia de las mismas de forma parcial o subtotal, así como a nivel de las microvellosidades, similar a la histopatología observada en la enfermedad celíaca (Bartelt *et al.*, 2015).

Las alteraciones histopatológicas en la giardiosis humana fueron inducidas experimentalmente en gerbos infectados con quistes y trofozoítos de origen humano, y en ratones infectados con *G. muris*. Los ratones infectados con *G. muris* mostraron una rápida producción y migración de los enterocitos inmaduros hasta el borde de las vellosidades (Buret *et al.*, 1992; Reynoso-Robles *et al.*, 2015).

En particular, la pérdida de la longitud de las microvellosidades contribuye a la pérdida de actividad de las enzimas y transportadores que se encuentran en ellas, tales como las disacaridasas (lactasa, maltasa y sacarasa) (Mohammed & Faubert, 1995; Farthing, 1997) y los transportadores de fructosa GLUT-5. Por otro lado, y como mecanismos de defensa, la diarrea puede ser responsable de la hipersecreción de Cl^- , H_2O y Na^+ , así como de la reducción de la tripsina, la quimiotripsina y de la lipasa luminales observadas en la giardiosis clínica (Farthing, 1997).

Otros estudios como el de Fouad *et al.* (2014), sugieren la implicación de la giardiosis en la dispepsia (malestar localizado en epigastrio, plenitud, ardor, eructos, nauseas.). En el estudio realizado, se valoraron 120 pacientes con síntomas de dispepsia y se identificaron como causas principales de esta dolencia a *Helicobacter pylori*, enfermedad celíaca y a *G. intestinalis*. En estos resultados aparece que el genotipo de *Giardia* más prevalente era el A. Según estos autores, en Egipto la giardiosis es endémica y la prevalencia de este parásito en pacientes con dispepsia es del 44%.

La asociación entre *H. pylori* y *G. intestinalis* ya se ha descrito en estudios anteriores sobre población con dispepsia o gastritis crónica (Grazioli *et al.*, 2006; Ugras &

Miman, 2013). Igualmente se ha sugerido que los síntomas de la giardiosis podrían estar asociados con un aumento en el número de bacterias aeróbicas y/o anaeróbicas en el intestino delgado proximal o sobrecrecimiento bacteriano (Halliez & Buret, 2013). Se ha observado que pacientes con malabsorción e infectados con *G. intestinalis* tienen niveles elevados de tres especies de Enterobacteriaceae, en particular *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter hafniae*. El estudio de la microbiota asociada a la parasitosis por *Giardia* mediante métodos moleculares podría aportar una explicación tanto de la sintomatología como de la predisposición a contraer la enfermedad que ocurre en algunos grupos poblacionales como ya apuntaban otros estudios sobre dicha asociación (Bartelt & Sartor, 2015; Keselman *et al.*, 2016).

En la giardiosis, ha de considerarse la posibilidad de la aparición de síntomas extraintestinales sobre todo a largo plazo en infecciones crónicas. Aunque no suelen citarse en la literatura, hay estudios que apuntan que un 1/3 de pacientes parasitados de larga duración con *G. intestinalis* presenta dichos síntomas, entre los que cabe destacar las patologías oculares, las alergias (cutáneas y alimentarias) y las artritis (Halliez & Buret, 2013), las cuales remitirían tras eliminar al parásito.

La propia respuesta inmunitaria que se pone en marcha para defender de la infección puede tener efectos adversos con un papel importante de la activación de las células T como parte de la inmunidad adaptativa (Figura 7). Se ha propuesto que dichas células participan en la patogenia dañando directamente a los enterocitos y promoviendo el acortamiento de vellosidades y microvellosidades del epitelio intestinal (Scott *et al.*, 2004; Buret, 2005), provocando la activación de mastocitos y células dendríticas, la producción de anticuerpos de mucosa (Inmonoglobulina A, IgA) y de óxido nítrico (NO) (Andersen *et al.*, 2006; Röxtrom-Lindquist *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007). De igual forma, como resultado de la respuesta inmunitaria se podrían provocar modificaciones de la permeabilidad del intestino de forma directa o indirecta con el ataque de las uniones estrechas (Claudina I) (Troeger *et al.*, 2007).

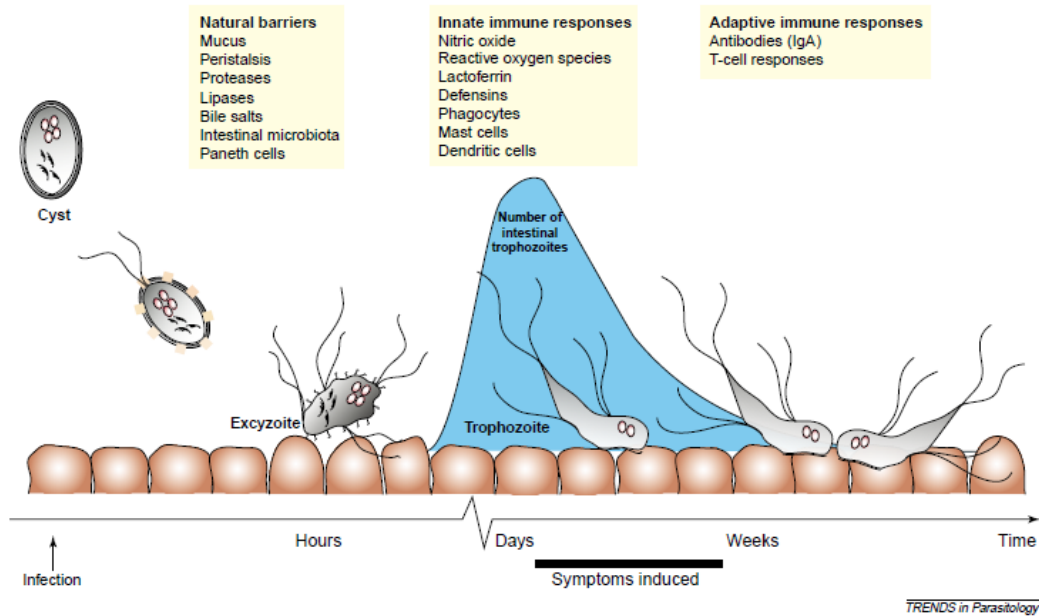


Figura 7. Evolución de la infección por *Giardia* en el tiempo y mecanismos de defensa (Roxström-Lindquist *et al.*, 2006).

Los niveles elevados de la interlequina 6 (IL-6), fueron descritos como producto de la presencia en el intestino de *Giardia* (Zhou *et al.*, 2003) al igual que el factor de crecimiento beta (TGF- β) (Ahmed *et al.*, 2018) lo que podría, a todas luces, inducir una respuesta mediada por linfocitos T cooperadores de tipo 17 (Th17) inflamatoria necesaria para la producción de la (IgAs) secretora presente en las mucosas de los animales y seres humanos infectados. La importancia de este tipo de respuesta inmunitaria se comprobó en casos de giardiosis crónicas en individuos con hipogammaglobulinemia (Onbaşı *et al.*, 2005) o con déficit selectivo de IgA. Así mismo, la transferencia de IgAs procedentes de mujeres infectadas administrada a ratones lactantes protege de la infección por *Giardia* (Korpe, 2013). De esta manera los estudios epidemiológicos mostraron como los niños amamantados con leche de madres infectadas con *G. intestinalis* tenían una baja incidencia (16%) frente a la de los niños de madres no infectadas (63%), lo que demuestra el papel protector de las inmunoglobulinas presentes en la leche (Téllez *et al.*, 2003). Los estudios *in vitro*

demuestran como las IgA secretoras actúan inhibiendo la adherencia de los trofozoítos a la mucosa intestinal.

El análisis de los antígenos reconocidos por las IgAs demuestra que son las VSG, antígenos variables de la superficie de *Giardia*, las principales dianas para dichos anticuerpos (Singer *et al.*, 2000). De igual manera también son reconocidos la α y β -tubulina, α y β -giardina, la arginina deaminasa (ADA); la ornitina carbamoiltransferasa (OCI) y la α -enolasa (Hassan *et al.*, 2002, 2005; Téllez *et al.*, 2005). Todas ellas son proteínas presentes en el disco adhesivo y en la parte dorsal de los trofozoítos. La ventaja diagnóstica que ofrece la producción de IgAs específicas en secreciones y mucosas frente a la infección, es que dichas inmunoglobulinas, dada su vida media corta (5,5 días), están presentes en la fase activa de la giardiosis y, puesto que la vida media de las células plasmáticas productoras de IgA es de 20 días, se mantendrán sus niveles detectables como máximo dos meses tras la erradicación, cosa que no ocurre con la IgG cuya respuesta permanece durante largo tiempo, incluso tras superarse la infección.

1.2.4 DIAGNÓSTICO DE LA GIARDIOSIS

El diagnóstico de esta enfermedad en los seres humanos puede hacerse por la observación microscópica de los quistes y/o trofozoítos en muestras de heces o de los trofozoítos en biopsias de mucosa intestinal o aspirado del fluido duodenal.

El diagnóstico tradicional coprológico se basa en la observación de las heces previamente tratadas mediante métodos de concentración con acetato de etilo-formaldehído, sulfato de cinc o dietiléter. Los trofozoítos o los quistes pueden ser observados, igualmente, en muestras teñidas (tricómico, hematoxilina de hierro) o mediante inmunofluorescencia directa (IFD) usando anticuerpos monoclonales para la detección de antígeno GSA 65 (Meridian Diagnostics), donde muestra una sensibilidad de 94% y una especificidad del 98% (Figura 8) (Koehler *et al.*, 2014; CDC, 2017).

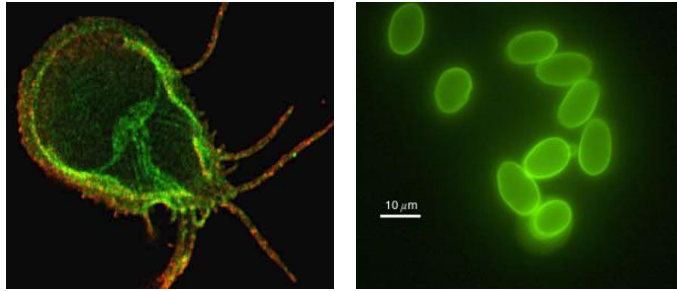


Figura 8. Inmunofluorescencia directa de trofozoíto y quiste de *Giardia* con anticuerpos monoclonales marcados con FITC.

Fuente: http://www.veterinaria.org/asociaciones/vet-uy/articulos/artic_can/100/0054/images/image013.jpg

Sin embargo, dado que los quistes de *Giardia* no aparecen en las heces de forma regular, la efectividad diagnóstica de la coprología, dentro de un sistema de sanidad no personalizado, resulta ineficaz, quedando muchos casos sin diagnosticar. La eliminación de los quistes sigue tres patrones de excreción: a) excreción alta, donde los quistes se encuentran en todas las muestras de heces del paciente; b) excreción baja, donde aparecen en aproximadamente en un 30% de las heces del paciente; y c) patrón mixto de excreción, donde los parásitos aparecen en periodos temporales alternos de 1 a 3 semanas con excreción elevada tras un período de baja excreción, quizás debido a las variaciones en la población presente en el intestino como consecuencia de las variaciones antigénicas del parásito (Koehler *et al.*, 2013).

Debido a la naturaleza intermitente de la excreción de los quistes, la sensibilidad del examen coprológico con una sola muestra de heces es de un máximo del 40%. Las técnicas de concentración y el estudio de tres muestras, obtenidas preferentemente cada dos días, aumenta la sensibilidad al 85%, pruebas repetitivas que en la mayoría de los casos son hospitalariamente irrealizables. La presencia de trofozoítos en las heces es poco frecuente, únicamente en heces diarreicas. Los trofozoítos son muy sensibles a las condiciones externas, produciéndose una lisis muy rápida de los

mismos, por lo que se recomienda la fijación rápida de las muestras fecales (Koehler *et al.*, 2013).

En aquellos pacientes con diarrea crónica y síndromes de malabsorción, donde el examen coprológico da repetidos resultados negativos se recurre a la búsqueda de los trofozoítos en el aspirado duodenal o bien se recurre a una biopsia. Aunque la biopsia es un procedimiento cruento, puede ser útil en algunos casos ya que permite un diagnóstico diferencial con otras enfermedades (Yakoob *et al.*, 2005).

Un método alternativo a la microscopía es la detección de antígenos de *Giardia* en heces; se consideran métodos simples, específicos y sensibles. Entre otras, se han desarrollado pruebas como la contraímmunoelectroforesis, con una sensibilidad y especificidad del 90% y 95%, respectivamente, si bien no es aplicada en los diagnósticos rutinarios de la enfermedad.

Actualmente, hay ensayos inmunoenzimáticos (EIA) comercializados con una especificidad del 99% (99,3 a 100%) y una sensibilidad entre 88,6% al 100%, donde se emplean anticuerpos frente al antígeno del parásito. Algunos de ellos usan anticuerpos monoclonales para la detección de GSA 65 o antígeno CWP1 (ProSpecT®, *Giardia* rapid de microplacas, *Giardia* ProSpecT® CELISA®TechLab) o anticuerpos policlonales (Cambridge microplacas ELISA Meridian Premier, Trend *G. lamblia* Direct Detection System, RS Test System) (Hopkins *et al.*, 1993).

La tira BIOSITE® Triage IC es una membrana inmunocromatográfica que permite la detección simultánea de antígenos de diferentes enteroparásitos como el complejo *Entamoeba dispar-Entamoeba histolytica*, *G. lamblia* y *Cryptosporidium parvum*. El anticuerpo monoclonal utilizado para *G. lamblia* detecta giardina con una sensibilidad y especificidad del 83% y 100%, respectivamente.

Los métodos inmunológicos clásicos basados en la detección de anticuerpos circulantes muestran una alta heterogeneidad con respecto a los resultados de sensibilidad y especificidad obtenidos. Se han desarrollado una amplia variedad de

métodos para el serodiagnóstico de la giardiosis: inmunofluorescencia indirecta (IFI), inmunodifusión, enzimoimmunoensayo (EIA), inmunotransferencia, etc.

La especificidad y la sensibilidad dependen principalmente del tipo de antígeno utilizado (trofozoítos intactos, extracto de trofozoítos, proteínas purificadas); del isotipo de inmunoglobulina estudiados y de la prevalencia de la infección en la zona geográfica (si es o no una región endémica). La utilidad de los métodos serológicos para el diagnóstico de la giardiosis humana es controvertida ya que no se ha demostrado de forma inequívoca su utilidad clínica (Behr *et al.*, 1997). A consecuencia de la respuesta inmunitaria adquirida, y como resultado de las investigaciones realizadas por algunos de los integrantes del equipo de investigación se detectó la presencia de inmunoglobulinas IgA secretoras en la saliva de individuos con giardiosis activa que reconocían una serie de antígenos nativos del parásito (Rosales-Borjas *et al.*, 1998; Hasan *et al.*, 2002). La detección de anticuerpos séricos, IgG contra *G. intestinalis* mediante ELISA indirecto demostró ser un método útil en estudios epidemiológicos para determinar la seroprevalencia de la giardiosis a nivel nacional en México (Cedillo-Rivera *et al.*, 2009). Pero además, estudios posteriores como el de El-Gebaly y colaboradores (2012) fueron más allá y evaluaron la utilidad de esta técnica analizando las respuestas de IgA e IgG tanto en muestras de saliva como de suero, y concluyendo que el análisis de los niveles de IgA secretora específica, además de para estudios epidemiológicos, puede ser empleada como herramienta diagnóstica de giardiosis, con más fiabilidad que la IgG que puede quedar aumentada por un periodo de tiempo mucho mayor tras haber superado la infección.

Por otro lado, mostraron que la resolución de la parasitosis provocaba un descenso rápido de la misma, por lo que podía resultar una herramienta útil para el seguimiento de la parasitosis y evaluación la eficacia del tratamiento. La detección de IgA en suero resultó ser significativamente menos sensible que la detección de IgAs en saliva para la detección de pacientes positivos. La ventaja de los ensayos salivales sobre los séricos es que la toma de muestra es más fácil y no invasiva, lo cual es importante especialmente para la toma de muestra en población infantil.

Del mismo modo, Rodríguez *et al.* (2004) informaron que los niveles de IgAs totales y específicos anti-*Giardia* fueron significativamente mayores en los niños/as con *Giardia* comparados con el grupo con otros protozoos ($p < 0,01$), y los no parasitados ($p < 0,001$). En un estudio similar realizado por Walterspiel *et al.* (1994), demostraron que la detección IgAs anti-*Giardia* en la saliva es un método de diagnóstico específico y fiable para este parásito. Para la respuesta de IgG contra la infección, tanto en saliva como en suero, demostraron que en niños/as infectados los niveles detectados resultaban significativamente mayores que en los no infectados ($p < 0,0001$), pero como inconveniente se encuentra el hecho de que los títulos de este isotipo de anticuerpos permanecen elevados durante meses o incluso años después de la infección primaria (Jokipii *et al.*, 1988), por lo que se podrían darse casos falsos positivos. La aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleada para el diagnóstico de giardiosis, convencional o cuantitativa a tiempo real, a partir de muestras de heces ha sido descrita por diversos autores. Para ello se ha utilizado diferentes cebadores que amplifican secuencias específicas de ciertos genes tales como β -giardina (bg), triosa fosfato isomerasa (tpi), glutamato deshidrogenasa (gdh), factor de elongación 1-alfa, espaciadores de genes del ADNr y del gen que codifica la subunidad pequeña del RNA ribosomal (SSU-rRNA) (Ghosh *et al.*, 2000; Bijllaardt *et al.*, 2014; de Lucio *et al.*, 2015; Flecha *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2016; Azcona-Gutiérrez *et al.*, 2017). La sensibilidad analítica para los diferentes cebadores específicos oscila en un rango de 1 a 10 quistes por mezcla de reacción demostrando que la PCR es más sensible que la microscopía óptica y la técnica del EIA.

Sin embargo, son técnicas que comienzan ahora a ser utilizadas en los laboratorios de rutina para el diagnóstico de giardiosis.

1.3 *BLASTOCYSTIS* SP.

Blastocystis es un protista del subreino Chromalveolata, filo Stramenopiles (Silberman *et al.*, 1996) y uno de los parásitos entéricos observados con mayor frecuencia en muestras de heces humanas a nivel mundial (Coyle *et al.*, 2011). El potencial patógeno de esta especie sigue siendo foco de intenso debate y uno de los temas candentes entre investigadores y clínicos (Stenvold *et al.*, 2007; Roberts *et al.*, 2014; Subirats & Borrás, 2018), así como si es necesario el tratamiento en todos los casos diagnosticados o solamente en determinadas situaciones (Kurt *et al.*, 2016).

1.3.1 CICLO BIOLÓGICO Y FORMAS DE VIDA

El ciclo biológico propuesto hasta la fecha es monoxeno y empieza por la ingestión del quiste vía manos sucias o por alimentos y aguas contaminadas; cuando llega al intestino, preferentemente íleon y colon, desenquista y libera trofozoítos con forma vacuolar que rápidamente se reproducen asexualmente dando lugar a formas multivacuolares y ameboides (Figura 9).

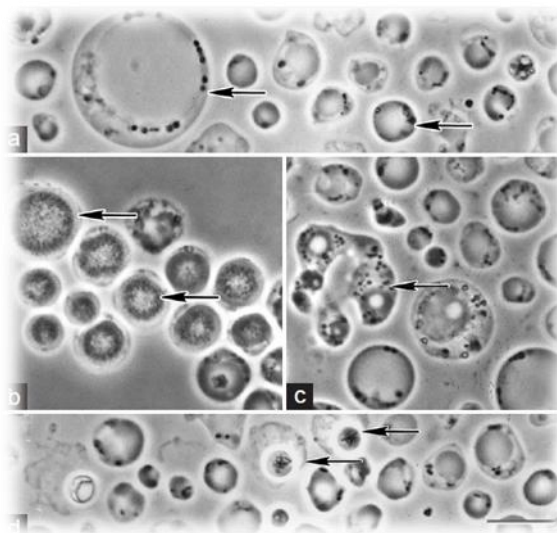


Figura 9. *Blastocystis* sp.: a. forma vacuolar; b. forma granular; c. forma amebode; d. forma quiste (Parija & Jeremiah, 2013).

Las formas multivacuolares originan quistes de pared fina responsables de las autoinfecciones, mientras que las ameboides desarrollan pre-quistes, que sufren una esquizogonia para finalmente formar quistes de pared gruesa, los cuales serán expulsados al medio externo junto a las heces (CDC, 2012).

1.3.2 EPIDEMIOLOGÍA DE LA BLASTOCISTOSIS

Blastocystis es cosmopolita, aunque se han registrado mayores prevalencias en países en vías de desarrollo ya que su transmisión va ligada a medidas higiénicas deficitarias y al consumo de aguas no tratadas debidamente (Turkeltaub *et al.*, 2015). Su prevalencia varía de un país a otros, superando el 5% en los países industrializados, con un 18,6% en España, 3,9% en Reino Unido, 6,1% en Francia y 7,1% en Italia reportados en estudios que emplean la microscopía óptica para el diagnóstico (Subirats & Borrás, 2018); y alcanzando del 30-60% en los países pobres. La transmisión puede ocurrir de animales a seres humanos, entre seres humanos, así como del ser humano a animales, lo cual explica su amplia distribución y las altas prevalencias mundiales. Los animales implicados en la transmisión zoonótica son cerdos, vacas, aves, roedores, reptiles, anfibios e incluso insectos (Stark *et al.*, 2007; Amaya *et al.*, 2015) (Figura 10).

Existe una distribución preferencial de los subtipos (STs) entre animales que parecen constituir el principal reservorio de contaminación ambiental y difusión a los seres humanos (Cifre *et al.*, 2018). Recientemente, un estudio en muestras fecales de perros y gatos de compañía en el norte de España no detectó ningún caso de, descartando la posibilidad de su papel como reservorio (de Paulos *et al.*, 2017). Por otro lado, un estudio realizado en muestras fecales de animales de consumo humano detectó una elevada prevalencia de *Blastocystis* sp. en cerdos (94,4%), seguido del ganado vacuno (29,4%) y de pequeños rumiantes (14%), aunque el estudio no fue más allá y los aislados quedaron sin tipificar (Arpitha *et al.*, 2018).

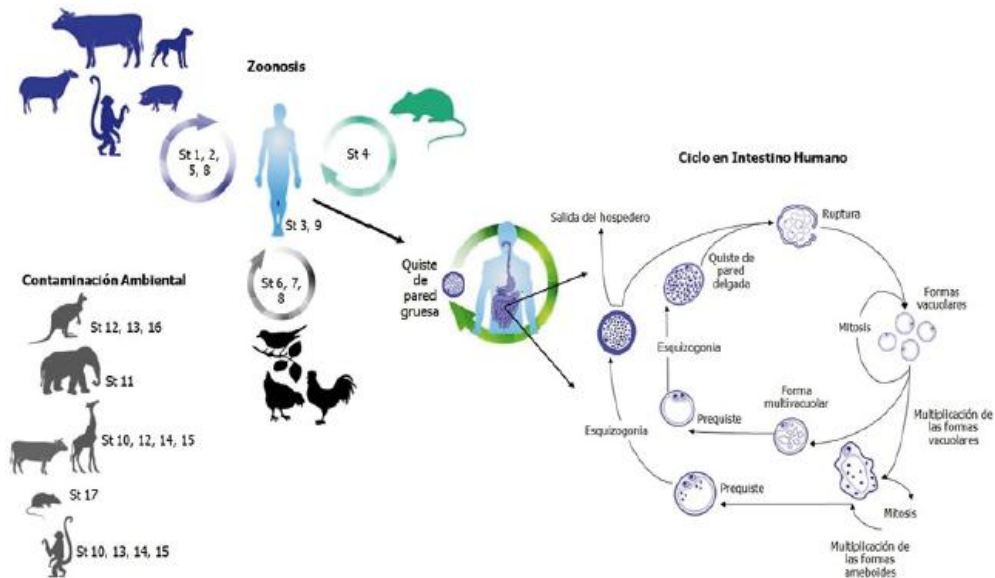


Figura 10. Ciclo de vida de *Blastocystis sp.* y distribución de subtipos (STs) entre animales domésticos y salvajes responsables de la transmisión zoonótica (Amaya *et al.*, 2015).

Basado en la secuenciación parcial del gen que codifica la subunidad pequeña del ARN ribosómico del parásito, se han identificado diecisiete subtipos (STs) (ST1 – ST17) detectándose los primeros nueve (ST1-ST9) en seres humanos (Roberts *et al.*, 2014; Adiyaman *et al.*, 2015). De los 17 subtipos conocidos, se ha secuenciado el genoma completo de tres, ST1, ST4 y ST7, encontrando una gran diversidad entre ellos en términos del tamaño del genoma, contenido de guanina-citosina (GC) y número de intrones. La secuenciación y anotación de otros genomas se está desarrollando y resultarán de utilidad para una mejor comprensión de la diversidad genética, la patogénesis y la evolución metabólica del parásito (Denoëud *et al.*, 2011; Wawrzyniak *et al.*, 2015; Gentekaki *et al.*, 2017; Cifre *et al.*, 2018).

1.3.3 PATOLOGÍA DE LA BLASTOCISTOSIS

Existe una gran controversia respecto al potencial patógeno de este parásito, y en la actualidad está siendo objeto de continua revisión. La blastocistosis habitualmente se acompaña de síntomas inespecíficos como diarrea, flatulencia, dolor y distensión abdominal debido a las proteasas que segregan, aunque también pueden aparecer síntomas extraintestinales como picores o urticarias cutáneas (Bálint *et al.*, 2014). Diversos estudios clínicos y epidemiológicos han confirmado a *Blastocystis* como patógeno intestinal demostrando su papel como agente causal de diarrea y lo han relacionado con el Síndrome de Intestino Irritable, aunque aún faltan estudios clínicos que expongan una evidencia fiable sobre una relación entre ambos (Domínguez-Márquez *et al.*, 2009; Coyle *et al.*, 2011; Fletcher *et al.*, 2012).

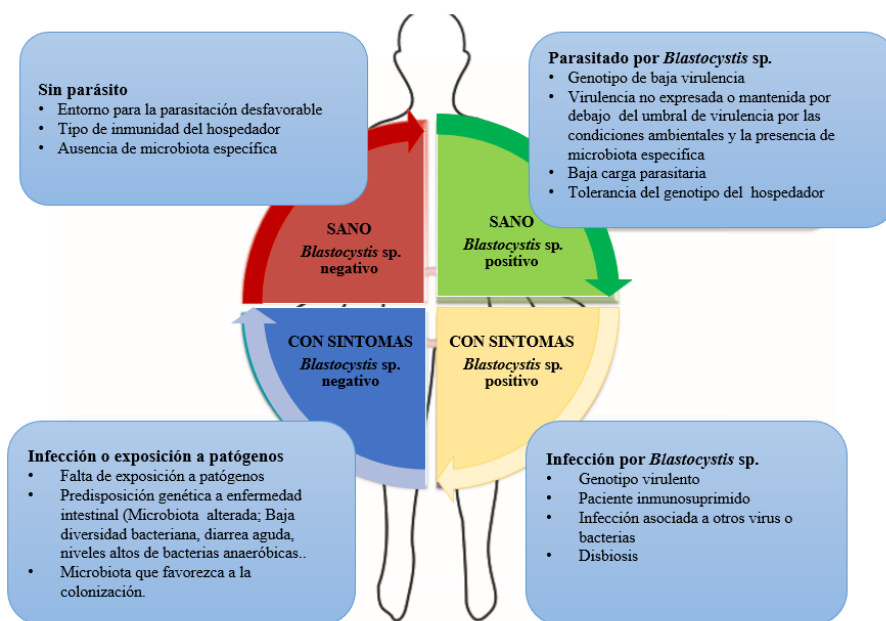


Figura 11: Situaciones clínicas en función de la relación *Blastocystis sp.*-ser humano.

Fuente: Adaptado de Scalán *et al.*, 2013.

Por otro lado, Scalan y colaboradores en 2013 propusieron que este parásito se debe considerar no solo como un patógeno, sino también como un posible comensal ya que se ha encontrado en hospedadores asintomáticos (Figura 11). Dichos autores apuntaban que su presencia en las heces podría usarse como un biomarcador de la funcionalidad intestinal. Así pues, la patogenicidad de este parásito podría depender no solo del genotipo y de la virulencia asociada a éste, sino también de factores del hospedador como su estado inmunológico, co-infecciones o enfermedades previas (intestinales y extra-intestinales) que puedan producir una alteración en la microbiota intestinal o del microambiente intestinal en general.

1.3.4 DIAGNÓSTICO DE LA BLASTOCISTOSIS

Los métodos empleados para la detección de rutina en muestras fecales son los microscópicos, tales como la tinción con lugol y la coloración tricrómica, mientras que el cultivo y los métodos moleculares son los de elección para propósitos de investigación. La sensibilidad del lugol es baja, el cultivo de los parásitos es laborioso y consume mucho tiempo, y los métodos basados en la amplificación génica (PCR) son costosos. La fluorescencia directa con anticuerpos (DFA) es considerada como el método más fiable para el diagnóstico, pero su empleo es limitado, lo que significa que las infecciones se subestiman (Cifre *et al.*, 2018).

1.4 OTROS PARÁSITOS INTESTINALES

Otros parásitos intestinales también relacionados en la literatura con trastornos gastrointestinales son los protozoos *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba coli*, *Endolimax nana*, así como el nematodo *Strongyloides* spp. (Stark *et al.*, 2007).

Cryptosporidium spp. es un parásito de amplia distribución, altamente transmisible e infectante, frecuentemente asociado con aguas de consumo o recreativas contaminadas o no tratadas convenientemente, siendo uno de los patógenos entéricos más frecuentes en los seres humanos (Satoskar *et al.*, 2009; Cacciò & Chalmers, 2010; Horton *et al.*,

2018). Se trata de un protozoo intracelular de ciclo directo, que coloniza el intestino delgado, preferentemente duodeno, causante de la criptosporidiosis. En pacientes inmunocomprometidos puede causar diarrea acuosa muy abundante, dolor abdominal, vómitos y fiebre (Fayer & Xiao, 2007). En cambio, en pacientes inmunocompetentes tras una fase aguda de diarrea, suele autolimitar de forma espontánea. Diversos estudios han demostrado que la dosis infectante para seres humanos es muy baja, la ingestión de 1-30 ooquistes puede causar la infección, siendo la principal vía de transmisión la hídrica (aguas de consumo y aguas recreativas) por su resistencia a los desinfectantes tradicionales (Huang *et al.*, 2004; Carmena *et al.*, 2007).

Otros protozoos intestinales como *Dientamoeba fragilis* han sido estudiados en relación al síndrome de intestino irritable. Muchos de los síntomas de SII son similares o iguales a los que causan los parásitos intestinales. Por ello es esencial que todos los pacientes con SII se sometan a investigaciones parasitológicas con el fin de descartar la presencia de protozoos intestinales como agentes causales de los signos clínicos (Stark *et al.*, 2006; Barrat *et al.*, 2011).

Existen otros protozoos, de menor relevancia clínica y frecuentes en muestras fecales humanas: *Endolimax nana*, *Entamoeba coli*, *Chilomastix mesnili*, *Entamoeba hartmanni* y *Iodamoeba butchlii*. No obstante, su presencia se debe valorar si el paciente refiere sintomatología gastrointestinal compatible con alteraciones del tránsito, meteorismo, dispepsia, distensión abdominal, para valorar de forma individualizada si se requiere el tratamiento farmacológico en ausencia de otras posibles causas (Stark *et al.*, 2006).

1.5 DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE LOS HIDRATOS DE CARBONO

Actualmente en nuestra sociedad los hidratos de carbono son el macronutriente que más porcentaje de calorías aportan a nuestra dieta, alrededor del 50%. En concreto, la ingesta de azúcares simples ha aumentado en los últimos años, en forma de productos ultra procesados con gran cantidad de azúcares añadidos como (bollería, refrescos,

cereales refinados, zumos envasados...) (Alliende, 2007). La digestión de los hidratos de carbono ocurre a través de una compleja serie de reacciones mediadas por las amilasas salivares y pancreáticas, y por disacaridasas ancladas a la membrana de los enterocitos de la superficie del intestino delgado. Los disacáridos (lactosa, sacarosa y maltosa) para ser absorbidos en intestino delgado requieren de un proceso de hidrólisis previo por enzimas específicas, resultando en monosacáridos tales como, glucosa, galactosa y fructosa, que a su vez se valen de transportadores específicos ubicados en la membrana apical y basolateral del enterocito para su absorción (Alliende, 2007; Zugasti, 2009; Riveros *et al.*, 2014).

Así pues, son los enterocitos maduros localizados en la parte apical de las vellosidades intestinales los responsables de la absorción completa de los monosacáridos. Estos monosacáridos, son hidrosolubles por lo que no pueden atravesar la bicapa lipídica de la membrana celular, y, por tanto, es necesaria la existencia de proteínas transportadoras específicas que faciliten su paso al interior de las células (Figura 12).

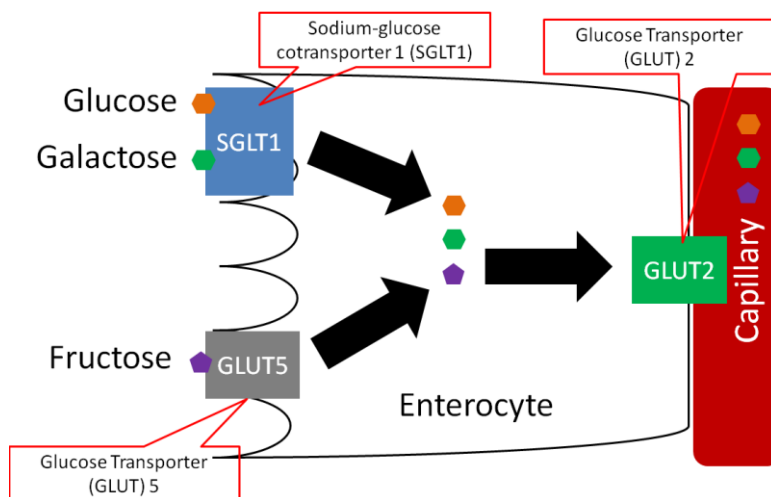


Figura 12: Transportadores implicados en la absorción intestinal de los monosacáridos. SGLT-1: co-transportador activo de Na⁺ por glucosa o galactosa; GLUT-5: transportador de fructosa desde la luz intestinal al interior del enterocito; GLUT-2: transportador de glucosa, galactosa y fructosa hasta los capilares sanguíneos (Lindshield & Adhikari, 2013).

Las células epiteliales absorben estos azúcares simples a través de mecanismos de difusión facilitada por transportadores de la familia GLUT (*glucose transporters*) como el GLUT-5 localizado en yeyuno y que prácticamente es un transportador de fructosa porque su afinidad por otros monosacáridos es mínima, y el GLUT-2 localizado en la membrana lateral y basal de los enterocitos de intestino delgado, entre otros, y que transporta glucosa, galactosa y fructosa hasta los capilares sanguíneos. Otros transportadores con mecanismos de transporte activo secundario, son los SGLT (*sodium-glucose transporters*), como el SGLT-1 que intercambia dos moléculas de sodio por una de glucosa o galactosa (Díaz & Burgos, 2002; Lindshield & Adhikari, 2013; Riveros *et al.*, 2014). Tras la absorción, los azúcares se incorporan al torrente sanguíneo y a través de la circulación llegan a los diferentes tejidos donde serán captados por las células y utilizados para generar ATP y sintetizar los metabolitos necesarios para que las células puedan desempeñar su función. La mayor parte de la galactosa y de la fructosa es convertida en glucosa para el metabolismo celular o para su almacenamiento (Guyton *et al.*, 2001).

Cuando el daño sobre el epitelio intestinal que conforman las vellosidades es intenso o leve pero crónico, la renovación celular no alcanza el ritmo normal, acortándose las vellosidades, y con ello los enterocitos apicales pierden capacidad de absorción al no alcanzar el grado de madurez necesario, comprometiéndose, total o parcialmente, su actividad enzimática y transportadora, perdiéndose capacidad de absorción de nutrientes y micronutrientes. En ausencia o falta de actividad por parte de las disacaridasas o de los transportadores, los azúcares de la dieta no pueden ser absorbidos, constituyendo así un sustrato fermentable para las bacterias colónicas lo que incrementaría la osmolaridad en el lumen intestinal, predisponiendo así al desarrollo de una serie de síntomas como inflamación, distensión abdominal, malestar, dolor e incluso diarrea; síntomas característicos de trastornos gastrointestinales con diferentes etiologías, entre ellas las intolerancias alimentarias (Alliende, 2007; Zugasti, 2009).

La prevalencia de malabsorción/intolerancia de lactosa o fructosa en la población general no es del todo conocida. En estudios realizados en pacientes con trastornos funcionales digestivos la prevalencia se sitúa en el 60% para la fructosa, 51% para la lactosa y 33%, para ambos (Wilder-Smith *et al.*, 2014).

1.5.1 LACTOSA

La lactosa es un disacárido formado a su vez por dos monosacáridos, glucosa y galactosa, presente de forma natural en la leche y sus derivados (yogur, queso, kéfir...). Se usa como aditivo en la industria farmacéutica y también como conservante en la industria alimentaria, por ello es habitual encontrar también lactosa entre los ingredientes de derivados cárnicos como el fiambre o embutidos con el propósito de alargar la vida útil del producto (Yang *et al.*, 2013).

La malabsorción/intolerancia a la lactosa es causada por un déficit (total o parcial, primario o secundario) de la enzima lactasa, que impide la correcta hidrólisis de la lactosa. En las sociedades que no consumen lácteos, la producción de lactasa desciende en el 90% de los casos durante los primeros 4 años de vida. Sin embargo, en poblaciones donde el consumo de leche es habitual durante años, se ha detectado que un alto porcentaje de la población mantiene una actividad lactasa persistente en la edad adulta. Como consecuencia de esto la prevalencia de intolerancia primaria a la lactosa (persistente) a escala mundial varía ampliamente según el origen étnico. En Europa central en general es de 30 a 50%. Es menos frecuente en poblaciones del norte de Europa, siendo menor al 10% en países como Suecia o Finlandia. En España la incidencia de déficit de lactasa es del 15% entre la población adulta sana (Scrimshaw & Murray, 1988; Heyman, 2006; Allende, 2007).

La lactasa se sitúa a nivel de las microvellosidades de los enterocitos apicales de yeyuno e íleon proximal. En el caso de la intolerancia primaria a la lactosa o hipolactasia adquirida, el paciente presenta el fenotipo lactasa no persistente que indica que una persona padece o padecerá el déficit de la enzima intestinal lactasa (hipolactasia) a lo largo de su vida, lo que puede propiciarle intolerancia permanente a

la lactosa. Actualmente se conocen 5 polimorfismos genéticos de un solo nucleótido (SNPs) asociados con el fenotipo lactasa persistente, dos de ellos son más frecuentes en poblaciones de origen caucásico y los otros tres en poblaciones de origen africano, todos ellos presentes en la secuencia del gen *MCM6*, conocido por regular la expresión de la lactasa. Los genotipos de riesgo para los 5 SNPs del gen *MCM6* asociados a la hipolactasia y a la intolerancia primaria a la lactosa aparecen reflejados en la Tabla 3 (Fajardo *et al.*, 1994; Swallow, 2003; Infante, 2008).

Tabla 3: Genotipos de riesgo para los 5 SNPs del gen *MCM6* asociados a la hipolactasia.

| Polimorfismos <i>MCM</i> | Alelo riesgo | Genotipo riesgo |
|-----------------------------|--------------|-----------------|
| C/T-13910 | C | CC |
| G/A-2208 | G | GG |
| G/C-14010 | G | GG |
| T/G-13915 | T | TT |
| C/G-13907 | C | CC |

En el caso de la malabsorción a lactosa secundaria, se trata de una deficiencia transitoria de actividad lactasa, en sujetos con actividad persistente lactasa, debida a enfermedades o situaciones que afectan a la mucosa intestinal alterándose con ello la actividad enzimática. Entre ellas cabe destacar las enfermedades gastrointestinales que conlleven una afectación de la mucosa intestinal acompañadas de inflamación, como son la enfermedad celíaca, las alergias a alimentos, la enfermedad de Crohn, u otras afecciones de origen infeccioso (virales, bacterianas, fúngicas o parasitarias) (Ginard *et al.*, 2003; Alliende, 2007; Reyes-Huerta *et al.*, 2010; De los Santos *et al.*, 2012). La identificación de la lactosa como causante de la malabsorción/intolerancia justifica la rectificación de la dieta en dirección a modificar su aporte a corto plazo con el objetivo de mejorar la sintomatología del paciente.

1.5.2 FRUCTOSA

La fructosa es un monosacárido que está ampliamente presente en la dieta (frutas, vegetales, miel, zumos, bollería, repostería...) en forma de fructosa libre o de disacáridos como sacarosa. La sacarosa al llegar al estómago sufre una hidrólisis y como consecuencia se liberan los monosacáridos glucosa y fructosa, los cuales serán absorbidos a nivel intestinal hasta el torrente circulatorio por la acción de transportadores específicos de forma activa (Figura 12) (Díaz & Burgos, 2002; Lindshield & Adhikari, 2013). Su absorción se da preferentemente en la parte alta del intestino delgado. En la membrana apical de los enterocitos, a nivel de las microvellosidades, se encuentra el transportador específico de fructosa GLUT-5, que la internaliza en el enterocito. Otro transportador de fructosa desde la luz intestinal, pero de baja afinidad, es el GLUT-2, que también es capaz de transportar otros monosacáridos como la glucosa y galactosa. Después del transporte apical mediado por GLUT-5 o GLUT-2, la fructosa es transportada al torrente circulatorio por GLUT-2 en la membrana basolateral (Díaz & Burgos, 2002; Jones *et al.*, 2010; Lindshield & Adhikari, 2013; Riveros *et al.*, 2014)

La distribución de GLUT-5 en el intestino es mayor en la zona proximal (duodeno y yeyuno proximal) en comparación con segmentos distales (yeyuno e íleon distal) y su expresión génica parece estar estrictamente regulada por factores como la nutrición, hormonas y ritmos circadianos. En adultos, tanto en ratas como humanos, la expresión y actividad del GLUT-5 esta aumentada 5 veces en comparación a los recién nacidos, además los niveles de expresión de la proteína están aumentados en un 65% con una dieta alta en fructosa. Por lo tanto, la expresión y función de GLUT-5 se ha visto incrementada en dietas altas en fructosa y también se puede ver reducida en dietas bajas (Douard *et al.*, 2008). Otro hecho importante a tener en cuenta sobre la absorción de la fructosa es que la capacidad de absorción de ésta aumenta en presencia de otros monosacáridos, como glucosa o galactosa y algunos aminoácidos, y disminuye por la presencia de sorbitol (polialcohol presente en algunas frutas, bollería, y productos con la denominación de “sin azúcar añadido”), ya que al parecer compartiría el

transportador GLUT-5 con la fructosa y podrían saturarse más rápidamente (Fernández-Bañares *et al.*, 2009; Hinojosa-Guadix *et al.*, 2017).

Así pues, la malabsorción a fructosa secundaria se produce cuando se interfiere el normal funcionamiento de dichos transportadores, generando una malabsorción de la fructosa dietética ingerida y generando toda la sintomatología asociada (meteorismo, distensión abdominal, alteraciones del tránsito...) (Reyes-Huerta *et al.*, 2010; Hammer *et al.*, 2018).

Tabla 4: Mutaciones genéticas más comunes en el gen *ALDOB* asociadas con la fructosemia o intolerancia hereditaria a la fructosa.

| Mutaciones <i>ALDOB</i> | Alelo riesgo | Genotipo riesgo |
|-------------------------|--------------|-----------------|
| R590P | T | TT |
| D4E4 | D | DD |
| AI50P | C | CC |
| AI75D | A | AA |
| L256P | C | CC |
| N334K | G | GG |
| A337V | T | TT |

Cabe destacar que también existe la intolerancia a fructosa primaria o fructosemia, que se define como un trastorno congénito hereditario causado por la alteración del gen aldolasa B (*ALDOB*), la cual produce la incapacidad de metabolizar alimentos que contengan fructosa, sacarosa y/o sorbitol. El gen *ALDOB* puede presentar distintas mutaciones responsables de la enfermedad, pero siete de ellas son las causantes de más del 90% de los casos de intolerantes a fructosa genéticas. Habitualmente suele presentarse en las primeras etapas de vida, con sintomatología muy diversa y no únicamente gastrointestinal (Cornejo *et al.*, 2004). Para que un individuo presente la

enfermedad necesita ser portador de dos copias de la misma mutación, es decir homocigoto, o una copia de al menos dos mutaciones, es decir heterocigoto. Los genotipos de riesgo para las 7 mutaciones genéticas más comunes en el gen *ALDOB* asociadas con la fructosemia aparecen reflejados en la tabla siguiente (Tabla 4) (Ali *et al.*, 1998; Sánchez-Gutiérrez *et al.*, 2002).

El tratamiento de la malabsorción/intolerancia a lactosa y fructosa, implica unas intervenciones dietéticas personalizadas y guiadas por un dietista-nutricionista con el objetivo de no provocar carencias en la alimentación que pudiesen conllevarle a largo plazo repercusiones a nivel nutricional o incluso a nivel metabólico (Fedewa *et al.*, 2014).

Al desplazar de la alimentación frutas y verduras sin ningún tipo de protocolo o supervisión de un profesional, además de la introducción de otros alimentos no saludables como sustitución de estos, a largo plazo, podría aumentar el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, estreñimiento o incluso aumento del riesgo de padecer cáncer de colón por la restricción o disminución de alimentos de origen vegetal, única fuente dietética de fibra (Rubio, 2002; Rodrigo & Riestra., 2007; Sánchez *et al.*, 2015). En algunos pacientes tras las intervenciones dietéticas personalizadas no se consigue la mejoría sintomática deseada, por lo que, en estos casos, debemos sospechar de otras causas subyacentes haciéndose necesarios estudios desde otra perspectiva, como podría ser una parasitosis crónica que lleve asociada una inflamación intestinal leve pero persistente y que origine o agrave los síntomas gastrointestinales manifestados por el paciente.

CAPÍTULO SEGUNDO

OBJETIVOS

Recientemente se ha revisado el papel de los parásitos intestinales en la etiología de los trastornos digestivos funcionales, caracterizados por molestias abdominales asociadas a una reactividad intestinal alterada en respuesta a estímulos luminales (bacterias, parásitos o alimentos) o psicósomáticos. Asimismo, diversos trabajos relacionan positivamente las parasitosis con síntomas gastrointestinales del tipo: SII, dispepsias y malabsorción de carbohidratos (D'Anchino et al., 2002; Moya-Camarena et al., 2002; Yakob et al., 2005; Grazioli et al., 2006; Stark et al., 2006, Hanevik et al., 2009; Fouad et al., 2014, Ögren et al., 2016). La enteritis que suele acompañar a las parasitosis se caracteriza por un aumento de la apoptosis de los enterocitos, una renovación celular acelerada, un transporte anormal de electrolitos, una pérdida de la función barrera de la mucosa (afectación de las uniones estrechas) y, de forma secundaria, la penetración de bacterias comensales. Estos serían los principales mecanismos propuestos como responsables de la fisiopatología de dichas parasitosis, las cuales llevarían asociados cuadros de mala digestión y malabsorción (Cotton et al., 2011; Chen et al., 2013; Halliez & Buret, 2013).

La hipótesis del presente estudio plantea que detrás de cuadros de malabsorción a lactosa y/o fructosa, cada vez más frecuentes en nuestra sociedad, puedan estar las parasitosis intestinales no diagnosticadas. Por ello, se propone determinar si existe la parasitación empleando la estrategia diagnóstica más eficaz, y en caso positivo analizar la relación entre parásitos y malabsorción, sintomatología y alteraciones analíticas. Se realizarán intervenciones terapéuticas personalizadas, combinando antiparasitarios convencionales y pautas dietéticas actualizadas con reintroducción de alimentos y, finalmente, se repetirán las pruebas de malabsorción para valorar los niveles de tolerancia alcanzados y la eficacia de la intervención. El hallazgo de la parasitosis intestinal como causa de la misma podría cambiar drásticamente el curso de esta enfermedad pasando de considerarse una enfermedad crónica a una enfermedad con tratamiento específico y definitivo que supondría la curación de la enfermedad parasitaria y, secundariamente, de la malabsorción.

El **objetivo general** de la presente Tesis Doctoral es analizar si existe una relación entre las parasitosis intestinales y la malabsorción de carbohidratos. En caso de la coexistencia de ambas variables, se valorará la eficacia de la terapia combinada (farmacológica y nutricional).

Para abordar este objetivo general, se han definido los siguientes **objetivos específicos**:

1. Determinar de la prevalencia de parásitos intestinales en pacientes adultos con malabsorción a carbohidratos.
2. Identificar las especies parásitas, los factores de riesgo y las rutas de transmisión más frecuentes en nuestro medio.
3. Establecer los métodos diagnósticos más adecuados para el análisis parasitológico del grupo de estudio.
4. Identificar las alteraciones analíticas más frecuentes que acompañan a cuadros de malabsorción y parasitosis.
5. Evaluar los tratamientos farmacológicos empleados para tratar las parasitosis.
6. Diseñar modificaciones dietético-nutricionales personalizadas y adecuadas a los periodos de tratamiento y recuperación.
7. Evaluar la eficacia de la terapia combinada sobre la recuperación de la absorción de carbohidratos.
8. Analizar el papel de los parásitos intestinales en la etiología o evolución de la malabsorción de carbohidratos.
9. Educar sobre el control y prevención de las infecciones por parásitos intestinales.

CAPÍTULO TERCERO

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 SUJETOS DE ESTUDIO

El presente trabajo trata de un estudio clínico prospectivo transversal con duración de 20 meses consecutivos (desde noviembre del 2013, hasta junio del 2015) y que incluye a los siguientes grupos y subgrupos de individuos: grupo Pacientes (P), que a su vez esta dividido en dos subgrupos; con malabsorción a lactosa o fructosa (A) y sin malabsorción (B) y, por último, el grupo Control (C) (Figura 13):

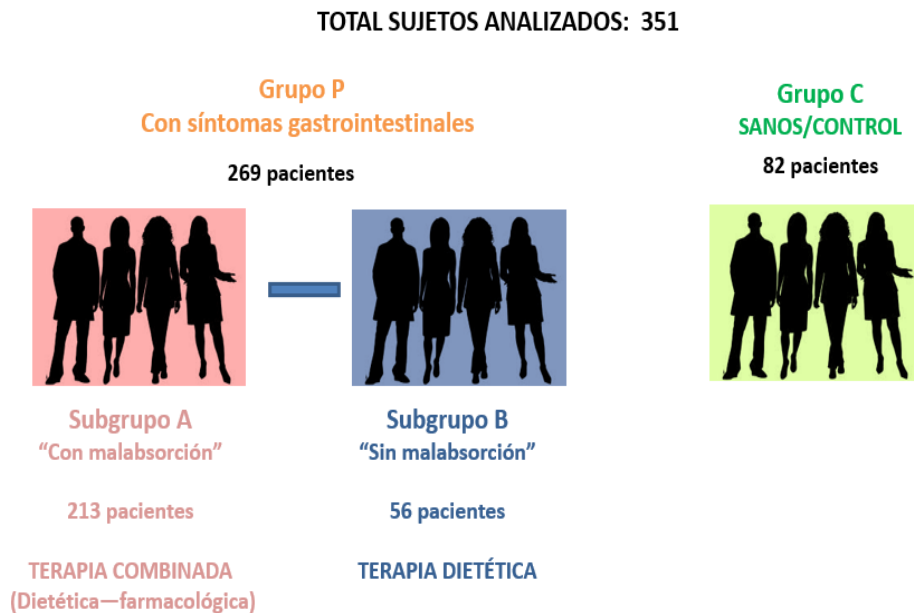


Figura 13: Esquema que representa los diferentes grupos y subgrupos de estudio y sus características.

1) “**Grupo P**”: pacientes con problemas gastrointestinales con al menos dos de los siguientes síntomas: distensión abdominal, flatulencia o alteraciones del tránsito intestinal, y que, por ello, fueron sometidos a la prueba de aire aspirado para valorar si presentaban malabsorción de azúcares simples (lactosa y fructosa). Los sujetos que mostraron malabsorción fueron catalogados como “con malabsorción” e incluidos en el “subgrupo A”; aquellos que por el contrario mostraron una absorción normal, a pesar de

la clínica compatible, se denominaron “sin malabsorción” y constituyeron el “subgrupo B”. El “subgrupo A” lo constituyeron 213 pacientes, 172 mujeres y 41 hombres con una edad media de 37 años y pruebas de malabsorción positivas realizadas en el Servicio de Medicina Digestiva (Unidad de Pruebas Funcionales), desde noviembre del 2013, hasta junio del 2015. Tras el diagnóstico de malabsorción, estos pacientes eran remitidos a la consulta del Servicio de Endocrinología y Nutrición del mismo hospital para recibir las recomendaciones dietético-nutricionales oportunas. El “subgrupo B” estuvo formado por 56 pacientes con síntomas gastrointestinales crónicos, 37 mujeres y 19 hombres con una edad media de 49 años, que a pesar de no mostrar una afectación de la absorción fueron incluidos en el estudio para el análisis parasitológico. Para la segunda fase del estudio, en la que se pretendía valorar la eficacia de la intervención terapéutica en la capacidad de absorción de carbohidratos, se definió un grupo “Control interno” dentro del subgrupo A. Consistió en pacientes con sintomatología y malabsorción a fructosa o lactosa, pero sin parásitos intestinales.

En la parte descriptiva, estos pacientes forman parte del subgrupo A, pero actúan como control interno, a la hora de valorar el papel de los parásitos en la etiología de la malabsorción de carbohidratos y la eficacia de la terapia dietético-nutricional. Este grupo lo formaron 7 pacientes, con malabsorción y no parasitados, a los que les aplicamos únicamente el manejo dietético-nutricional durante 1 año.

2) “**Grupo C**”: formado por adultos de características similares a los anteriores, en cuanto a edad y sexo, pero sin ninguna sintomatología gastrointestinal, ni en los 12 meses anteriores, ni en el momento de su inclusión. Este grupo estuvo constituido por 82 individuos sanos, 58 mujeres y 24 hombres con una media de edad de 25 años que participaron de forma voluntaria.

Los *criterios de inclusión* en el estudio fueron el presentar al menos dos de los signos y síntomas gastrointestinales crónicos principales y edades comprendidas entre 16-70 años. Se consideraron *criterios de exclusión*: el sangrado digestivo, los antecedentes neoplásicos, el tratamiento antibiótico en los últimos 30 días y los tratamientos crónicos con antiinflamatorios no esteroideos.

El tamaño muestral se calculó en base a los datos preliminares de prevalencia de parasitación que se obtuvieron tras el primer año de estudio: 40% para el subgrupo A; 25% para el subgrupo B; y del 15% para el grupo C. En base a estos datos, y estableciendo un nivel de significación $\alpha=0,05$, se estimó que serían necesarios 280 individuos con síntomas y malabsorción (A), 120 con síntomas y sin malabsorción (B), y 60 controles (C), para alcanzar una potencia estadística del 80%, tanto en la comparación entre pacientes (A y B), como respecto al control (C).

3.1.2 MUESTRAS BIOLÓGICAS

De cada uno de los participantes en el estudio se tomaron las siguientes muestras biológicas:

1) Saliva: se tomó una muestra de saliva en la primera visita. La saliva se recoge colocando un algodón en la parte posterior de la lengua durante 10 minutos. Tras ello, se introduce el algodón en un microtubo que contiene un medio conservante (195 μ L de inhibidor de proteasas, Complete™, Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (2X), Roche® + 5 μ L de bacteriostático, ProClin®, Sigma-Aldrich).

Una vez la muestra llega al laboratorio se recoge el algodón con una pinza y se introduce en una jeringa (1 mL) para ser exprimido recogiendo entre 400-500 μ L de saliva diluida en conservante (1/2) en el mismo tubo. A continuación, se centrifuga el tubo durante 10 minutos a 10.000 rpm para forzar la precipitación de células bucales y restos de comida. Se toman 150 μ L de sobrenadante y se introduce en un nuevo tubo y se mantiene a -80°C hasta su utilización.

2) Heces: se tomaron tres muestras de heces en días alternos. Las dos primeras se recibían en tubos con fijador SAF (1,5 g de acetato sódico, 2 mL de ác. acético, 4 mL de formaldehído y 92,5 mL de agua destilada); y la tercera muestra se recogía en tubo estéril sin fijador, el mismo día de la entrega, y se recibía en fresco en la segunda visita.

3) Sangre: se tomó a todos los participantes en el estudio una muestra de sangre en la segunda visita para el análisis de los siguientes parámetros: hemograma, bioquímica, serología y vitaminas por parte del Servicio de Análisis del hospital.

3.1.3 MATERIAL PARASITOLÓGICO

Para la detección de anticuerpos en la saliva frente a *G. intestinalis*, fue necesario disponer de antígenos, en concreto se empleó el lisado total de trofozoítos del protozoo mantenidos en cultivo axénico cultivados en medio TYI-S33, enriquecido con un 10% de suero fetal bovino y mantenidos a 37°C (Keister, 1983; Rosales-Borjas *et al.*, 1998; Hassan *et al.*, 2002). Las cepas empleadas fueron proporcionadas por la “American Type Culture Collection” (ATCCC ®: ATCC 30888, ATCC 30957 y ATCC 50137), mantenidas y cedidas por el Dr. Osuna desde el Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 DISEÑO EXPERIMENTAL E INTERVENCIÓN TERAPÉUTICA

El diagnóstico de la malabsorción a lactosa o fructosa se realizó mediante un método no invasivo, denominado test del aire espirado o “prueba del aliento”, donde se mide la concentración de hidrógeno (H₂) y metano (CH₄) en el aire exhalado. Esta prueba fue realizada por la Unidad de Pruebas funcionales del Servicio de Medicina Digestiva del Hospital La Fe con el cromatógrafo de gases: “Breath Testing: Hydrogen & Methane. (QuinTron®)”. Estos gases son producidos por la actividad bacteriana en el colon al fermentar los azúcares no absorbidos en el intestino delgado; cuanto mayor cantidad de azúcares llegue sin absorber a la porción final del intestino, mayores niveles de gases se detectarán en la prueba (Gibson *et al.*, 2007; Hinojosa-Guadix *et al.*, 2017). Una vez diagnosticados, y tras ser derivados al Servicio de Endocrinología y Nutrición del mismo hospital, se siguió el procedimiento detallado en la figura 14.

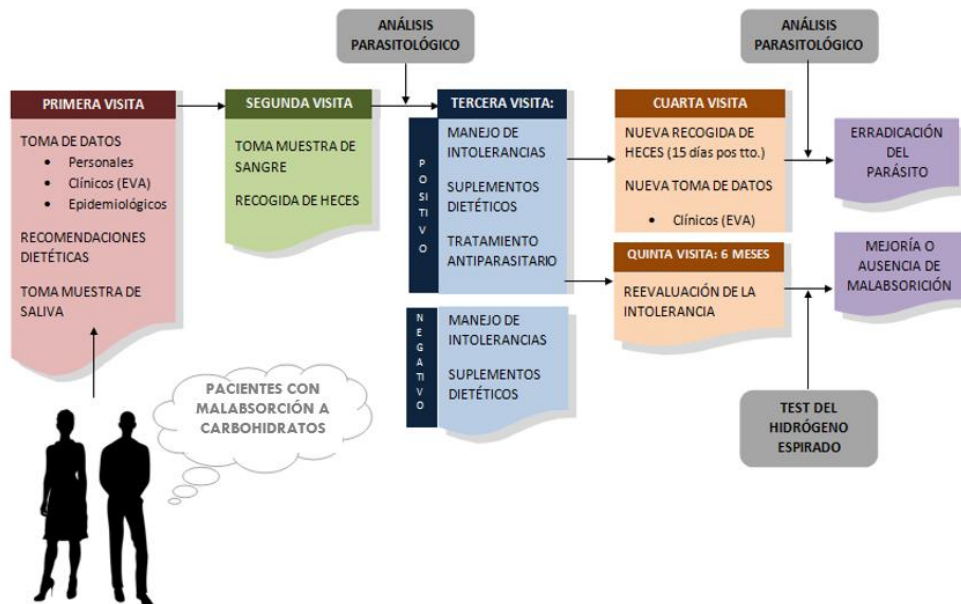


Figura 14: Esquema del diseño experimental y de la intervención terapéutica.

En la **primera visita**, se mantenía una entrevista con el paciente que incluía los siguientes pasos:

- Explicación detallada del estudio y de su implicación en el mismo, así como de las condiciones de participación. Si accedía a formar parte del estudio, firmaba el documento de Consentimiento Informado (Anexo I).
- Toma de datos del paciente mediante un cuestionario (Anexo II). Se tomaban datos personales y sociodemográficos, datos clínicos relacionados con padecer parasitosis intestinales, y toda aquella información relacionada con los hábitos, costumbres y situación personal que supusiera un riesgo de adquisición de los parásitos más frecuentes en nuestro entorno.
- Valoración por parte del paciente de la intensidad de los síntomas gastrointestinales de inclusión al estudio (distensión abdominal, flatulencias, alteraciones del hábito) según la Escala Visual Analógica (EVA), la cual cuenta con tres niveles de intensidad: leve, moderada o intensa, asociados a valores numéricos del 0 al 10 (Figura 15).



Figura 15: Escala visual EVA (Pérez *et al.*, 2015).

d) Modificaciones dietético-nutricionales personalizadas. Se realizaba una valoración de la dieta de base del paciente y se realizaban recomendaciones personalizadas con el objetivo de disminuir el consumo de azúcares simples, fructosa o lactosa, según intensidad de la sintomatología del paciente, para intentar mejorar o paliar los síntomas. Conforme iban evolucionando, y según cada caso, se empezaba a reintroducir progresivamente los azúcares retirados para favorecer la generación de tolerancia por parte del paciente.

f) Toma de muestra de saliva, tal y como se ha detallado en el apartado anterior sobre muestras biológicas.

En la **segunda visita**, se tomaba la muestra de sangre, y se les entregaba los botes para la recogida de heces acompañados del procedimiento a seguir. Los pacientes diagnosticados de parásitos intestinales, se citaban nuevamente al Servicio de Endocrinología y Nutrición.

En una **tercera visita** se pautaba el tratamiento antiparasitario y los suplementos dietéticos necesarios en cada caso y se proporcionaba seguimiento dietético-nutricional.

Una vez finalizado dicho tratamiento, en la **cuarta visita**, se repetían las pruebas parasitológicas para comprobar si el parásito había sido erradicado y se valoraban de nuevo los síntomas gastrointestinales.

Confirmada la eliminación de los parásitos, y pasado 1 año post-tratamiento, en una **quinta visita**, se repetían las pruebas del aire espirado para valorar la evolución de la sintomatología post-terapia y la eficacia de la intervención en la recuperación progresiva de la absorción, comparando individualmente con los resultados de las pruebas iniciales.

3.2.2 ANÁLISIS PARASITOLÓGICO DE MUESTRAS FECALES

El método de diagnóstico tradicional para las parasitosis intestinales, consiste en el examen microscópico de las heces, con y sin tinciones, para visualizar formas de resistencia parásitas, lo cual requiere de personal experimentado y cualificado para su reconocimiento y correcta identificación. Por este motivo, y por el hecho que algunos protozoos presentan un ritmo de emisión intermitente, resulta interesante el uso de métodos diagnósticos alternativos, que no requieran de la presencia del organismo íntacto para su reconocimiento y permitan procesar un gran número de muestras fecales de forma rápida. En este sentido, se planteó el emplear para el diagnóstico una combinación de métodos, tanto los tradicionales (microscopía óptica) con los más novedosos o moleculares: uno de ellos directo, para la detección de antígenos parasitarios en las heces, inmunocromatografía (ICT), y otro indirecto para valorar la respuesta inmunitaria del hospedador frente a *G. intestinalis*, mediante la detección de anticuerpos específicos inmunoglobulina A secretora (IgAs) anti-*Giardia* en saliva, un enzimoimmunoensayo (ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), tal y como se describe a continuación.

3.2.2.1 INMUNOCROMATOGRAFÍA

Una vez recogidas las tres muestras de heces, se empleó una porción de la tercera de ellas, mantenida en fresco, para realizar el test inmunocromatográfico. El resto se destinó, junto con las otras dos muestras, al análisis microscópico convencional.

El inmunoensayo cromatográfico empleado fue el kit comercial denominado *Simple Crypto-Giardia-Entamoeba* (Operon®) (Figura 16), un procedimiento rápido para la

detección cualitativa simultánea de antígenos de *Cryptosporidium parvum*, *Giardia intestinalis* y *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii* en muestras fecales frescas.



Figura 16. Kit de inmunocromatografía *Simple Crypto-Giardia-Entamoeba* (Operon®).

Fuente: <https://operon.es/es/cryptosporidium-giardia-entamoeba/>

Según las especificaciones del fabricante, y tomando como referencia el método de ELISA de captura en heces, dicho kit presenta una sensibilidad del 79,3% para *C. parvum*, 93,8% para *G. intestinalis* y 82,4% para el complejo *Entamoeba*. Esta sensibilidad por especie se combina con una especificidad muy elevada que oscila entre el 96,4% para *Entamoeba* y el 99,5% para *Cryptosporidium* (Figura 17).

| Name Nombre | Analyte Analito | Sample Muestra | Sensitivity Sensibilidad | Specificity Especificidad |
|-------------------------|--------------------|-------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Reference method: ELISA | | | | |
| Crypto | Cryptosporidium | Stool samples | 79,3% | 99,5% |
| Cry-Gia-Ent | | Heces | | |
| Giardia | Giardia | Stool samples | 93,8% | 98,9% |
| Cry-Gia | | Heces | | |
| Cry-Gia-Ent | | | | |
| Entamoeba | Entamoeba | Stool samples | 82,4% | 96,4% |
| Cry-Gia-Ent | | Heces | | |

Figura 17. Sensibilidad y especificidad del kit *Simple Crypto-Giardia-Entamoeba* (Operon®) en función del analito y como técnica de referencia el ELISA de captura en heces.

Fuente: <https://operon.es/es/cryptosporidium-giardia-entamoeba/>

Para la preparación de la muestra, realización e interpretación del test se siguieron las instrucciones del fabricante (Figura 18). Tomar heces de al menos tres sitios diferentes con el fin de obtener una muestra lo más representativa posible. Desenroscar el tapón del vial con cuidado de no derramar el tampón de extracción. Con el extremo del aplicador tomar una cantidad suficiente de heces (30-50 mg). Si las heces son líquidas coger con ayuda de una pipeta de 100 μ L y transferirlos al vial. A continuación, introducir el aplicador con la muestra en el vial. Enroscar bien el tapón y agitar vigorosamente para asegurar una mezcla homogénea. Sacar el dispositivo de reacción de la bolsa de aluminio. Romper el extremo superior del vial. Añadir 4 ó 5 gotas en la zona para la muestra del dispositivo de reacción y, por último, esperar 10 minutos, leer e interpretar el resultado.

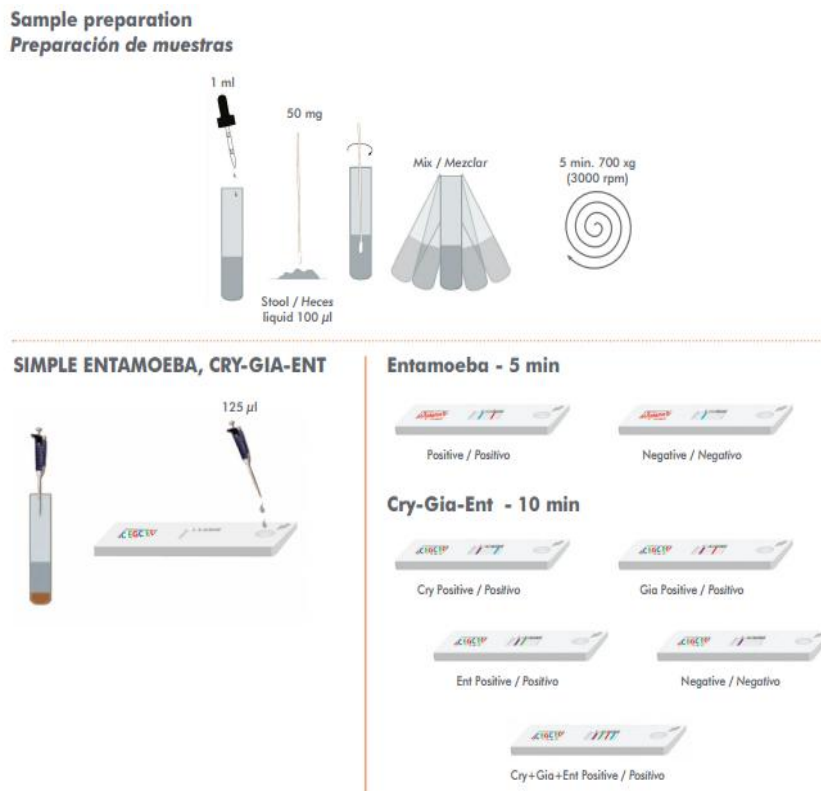


Figura 18. Preparación de la muestra, procedimiento e interpretación del *Simple Crypto-Giardia-Entamoeba* (Operon®).

Fuente: <https://operon.es/es/cryptosporidium-giardia-entamoeba/>

3.2.2.2 EXAMEN MICROSCÓPICO

Para realizar el examen microscópico se concentraron previamente las muestras fecales. El método de concentración empleado fue el Ritchie modificado (Knight *et al.*, 1976) o método del formol-acetato de etilo. Se trata de una técnica difásica de concentración de formas parásitas por sedimentación mediante centrifugación, con la que se extraen las grasas y el material mucoso presente en las heces. Se tomaban 3 mL de heces en fijador (1 mL de cada muestra) y se añadía 7 mL de formalina 10%, se tapaba el tubo y agitaba vigorosamente. Tras ello, se filtraba la mezcla a través de gasas y se recogía 7 mL de filtrado en un tubo de centrifuga. A este filtrado, se le añadía 3 mL de acetato de etilo y, tras agitar 30 segundos, se observaba si se cortaba o no la mezcla; en caso de que se cortara, se añadían unas gotas de agua del grifo y se agitaba de nuevo. Una vez emulsionado, se centrifugaba 3 minutos a 1.700 rpm con lo que se separaban varias fases en el tubo. Se separaba con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio la interfase y se decantaba todo el sobrenadante.

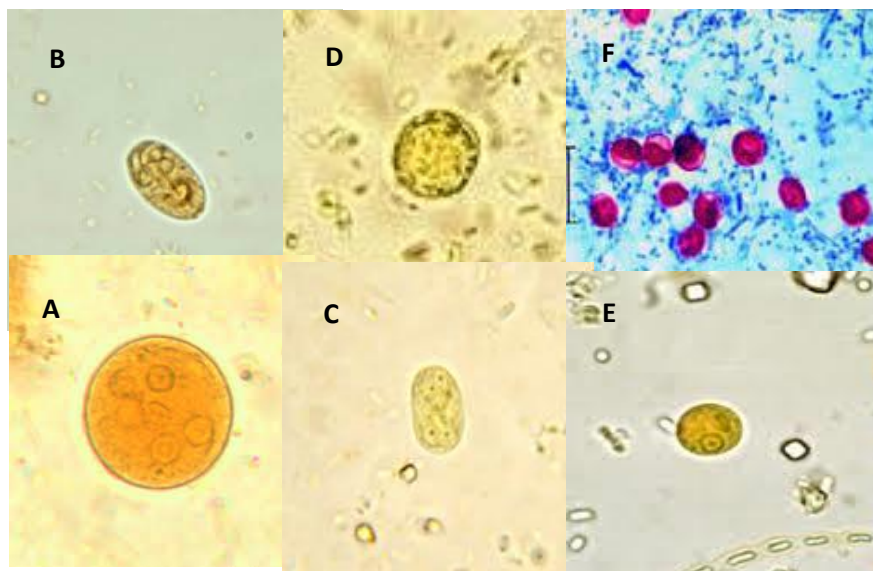


Figura 19. Quistes y ooquistes observados en las muestras fecales del estudio. A: *Entamoeba coli*; B: *G. intestinalis*; C: *Endolimax nana*; D: *Blastocystis* sp.; E: *Entamoeba hartmanni*; F: *Cryptosporidium* spp. (Ziehl-Neelsen modificado).

Obtenido el sedimento, se le añadían unas gotitas de formalina al 10% para su conservación, y con la ayuda de una pipeta Pasteur, se revisaban 4 gotas del sedimento al microscopio, con y sin Lugol, con los objetivos de 10X y 40X (Figura 19, A-E).

3.2.2.3 ZIEHL-NEELSEN MODIFICADO

La técnica *Ziehl-Neelsen* modificado es específica para la detección de ooquistes coccidios (*Cryptosporidium* spp., *Isospora belli* y *Cyclospora cayetanensis*) y facilita su identificación mediante microscopía óptica. Esta técnica fue modificada por la OMS en 1991. Los ooquistes de estos parásitos aparecen teñidos de color rojo vivo sobre un fondo azul intenso lo cual facilita mucho su observación (Figura 17, F), pero además, resulta de vital importancia en esta lectura la utilización del micrómetro ocular para medir las estructuras compatibles con los ooquistes.

A partir del sedimento obtenido tras la concentración, se realizaba un frotis de heces sobre un portaobjetos y se dejaba secar a temperatura ambiente durante 8-10 horas. Pasado este tiempo, se sumergían los portaobjetos en metanol durante 3 minutos para su fijación. Antes de comenzar con las series de tinciones se colocaban los portaobjetos en cestas de vidrio y se sumergían en una solución de colorante carbol-fucsina durante 10 minutos. Posteriormente, se decoloraba en solución alcohólica de ácido clorhídrico al 3%, mediante inmersiones y extracciones rápidas y sucesivas, para decolorar por arrastre (Figura 20).



Figura 20. Material empleado y resultado final de la tinción de Zielh-Neelsen modificado sobre frotis fecales.

La segunda tinción, consistía en sumergir los portaobjetos en un contracolorante, solución de azul de metileno, durante 1 minuto. Por último, se lavaba con agua del grifo y se dejaba secar al aire libre antes de la observación microscópica con el objetivo de 100x.

3.2.2.4 PCR A TIEMPO REAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE *G. intestinalis*

Teniendo en cuenta la baja sensibilidad que para *G. intestinalis* mostraban las técnicas convencionales, así como la inmunocromatografía, dentro del estudio se diseñó un ensayo con heces frescas de pacientes sospechosos de *Giardia* (presentaban de forma repetida niveles de anticuerpos específicos anti-*Giardia* elevados en saliva). Se ensayó el diagnóstico mediante amplificación de genes por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) considerado el método más eficaz y fiable para la detección del parásito en heces (Bolivar *et al.*, 2014; Bijllaardt *et al.*, 2014; de Lucio *et al.*, 2015; Flecha *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2016; Azcona-Gutiérrez *et al.*, 2017).

A partir de tres muestras de heces tomadas en fresco, en días alternos, se realizó la extracción del ADN a cada una de ellas, siguiendo el protocolo “QIAamp FAST DNA STOOL MINI KIT” (Qiagen ®). Se pesaban 180-200 mg de heces en un microtubo de 2 mL en el cual se añadían 750 µL de Buffer Inhibitex y se aplicaba vórtex durante un minuto hasta que la muestra estuviera totalmente homogeneizada. Tras calentar la suspensión durante 10 minutos a 95°C y aplicar vórtex durante 15s. Tras calentar las muestras, se centrifugaban durante 3 minutos a 13.000 rpm. En un nuevo microtubo se mezclaban 15 µL de Proteinasa K y se añadían 200 µL del sobrenadante del paso anterior y 200 µL de tampón de lisis o Buffer AL. Tras aplicar vórtex durante 15s, se incubaban los tubos a 70°C durante 10 minutos y se añadían 200 µL de etanol (96-100%). Cuidadosamente se pasaban 600 µL del sobrenadante a una columna QIAamp y se centrifugaba durante 3 minutos. Se colocaba la columna en un nuevo tubo y se descartaba el filtrado. Se añadía 500 µL de tampón de lavado 1 o Buffer AW1 y se centrifugaba durante un 1 minuto. Se colocaba la columna en un nuevo tubo y se descartaba el filtrado. Después, se añadían 500 µL de tampón 2 o Buffer

AW2 y se centrifugaba durante 3 minutos. Se volvía a descartar el tubo que contenía el filtrado, se colocaba la columna en un nuevo tubo de 2 mL y se centrifugaba durante 3 minutos. Por último, se transfería la columna QIAamp a un nuevo microtubo y se pipetea 100 μ L de Buffer ATE directamente a la membrana de la columna, se incubaba durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaba durante un 1 minuto para favorecer la elución del ADN que se conservaba a -20°C hasta su uso.

Una vez extraído el ADN total de las heces, se analizó la presencia de ADN de *G. intestinalis* mediante qPCR. Esta técnica es similar a la PCR convencional, pero se puede detectar si hay amplificación en cada ciclo del termociclador, permitiendo de forma semicuantitativa valorar la carga parasitaria en función del ciclo umbral (*Ct*, *threshold cycle*) al que comenzó a detectarse una señal de amplificación.

Para realizar esta técnica se preparó la siguiente mezcla de reacción para cada muestra: 4,5 μ L de agua destilada, 0,5 μ L de la mezcla que contiene los cebadores y sonda (FAM) específicos para amplificar un fragmento de 62 pares de bases del gen 18S del ARN ribosomal (cebadores para amplificar y sonda para detectar) (LightMix Modular Assays *Giardia*, Roche ®) y 10 μ L Máster Mix Quanta ® (dNTPs, tampón y Taq polimerasa termoestable). Por cada reacción, se mezcló 20 μ L de mezcla y 5 μ L de ADN muestra. Se incluyó un control positivo (ADN positivo) y un control negativo (agua estéril empleada para la mezcla en lugar de ADN).

Se empleó el termociclador de StepOne plus® (*Applied Biosystems*) con las condiciones de reacción establecidas por el fabricante y 45 ciclos de amplificación (Figura 21)

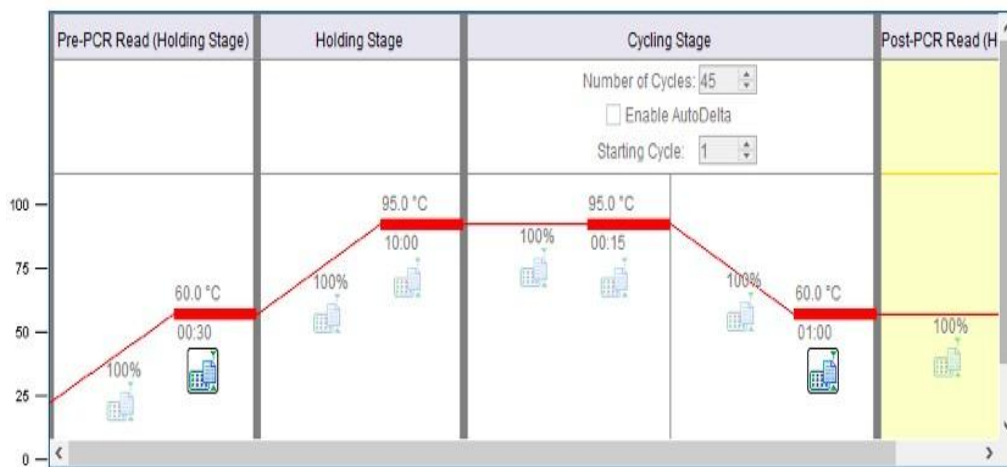


Figura 21. Condiciones de temperatura y tiempo empleadas para la PCR a tiempo real en el StepOne plus®.

El programa StepOnePlus™ Software v2.3 nos proporcionó la interpretación de los resultados con los Cts para cada muestra. Se consideraron positivas aquellas para las que se consiguió una señal de amplificación con $Ct \leq 43$.

3.2.3 DETECCIÓN DE IgA ANTI-*Giardia* EN MUESTRAS DE SALIVA

Otro de los métodos de diagnóstico alternativo al tradicional que se empleó para mejorar la sensibilidad del diagnóstico de *Giardia* fue el ensayo de inmunoenzimas, ELISA indirecto, para la detección de anticuerpos del tipo IgA secretora (IgAs) en la saliva del hospedador en respuesta a la infección. Con este método diagnóstico se podrían resolver los casos de giardiasis con baja carga parasitaria o casos crónicos con eliminación intermitente de formas quísticas en heces, que podrían resultar en falsos negativos con el coprodiagnóstico.

Esta técnica diagnóstica ha sido empleada con anterioridad en varios estudios sobre prevalencia de giardiasis, en los que se demostró una clara relación entre los altos niveles de esta inmunoglobulina en saliva y la infección activa. Aunque se trate de un protozoo no invasivo, sus componentes antigénicos son capaces de estimular los

órganos linfoides y provocar una respuesta humoral específica de mucosas con secreción de IgA (El Gebaly *et al.*, 2012).

A partir de placas previamente sensibilizadas con antígeno total de trofozoítos de *G. intestinalis* (10 µg/pocillo) se siguió un protocolo de ELISA indirecto “*in house*” adaptado de El-Gebaly y colaboradores (2012). En primer lugar, se bloqueaba la placa añadiendo 100 µL de PBS (NaCl 137mM; KCl 2,7mM; Na₂HPO₄ 10Mm, KH₂PO₄ 1,8Mm y pH 7,6) con albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5% durante 1 hora a 37°C. Tras tres lavados con PBS-Tween 20 (PBS-T) (0,05%) se incubaron duplicados de 100 µL de saliva (positivas, negativas y problema) diluidas previamente 1:2 en PBS-BSA 0,5%, durante 90 minutos a 37°C en agitación. De nuevo se realizaron 3 lavados con PBS-T y se incubó con anticuerpos anti-IgA secretora-humana conjugada con peroxidasa (*Goat anti-human alpha chain-HRP*, Abcam ®) diluidos 1/10.000 en PBS-BSA al 0,5%, durante 1 hora a 37°C en agitación. Para el revelado se empleó una solución con el cromógeno ortofenilendiamina (0,04%) en tampón fosfato-citrato (Na₂HPO₄ 0,2M; ácido cítrico 0,1M; pH 5,0) y sustrato H₂O₂ (0,001%) añadiéndose 100 µL/pocillo e incubación en oscuridad. La reacción se detuvo con 100 µL/pocillo de HCl 3N.

Finalmente se midieron los niveles de IgAs en saliva mediante la determinación de las absorbancias a 490nm (densidad óptica, DO) con un lector de placas ELISA (iMark™-Bio-Rad). La media y desviación estándar de las DO obtenidas para los controles negativos se emplearon para calcular el *cut-off* o límite de positividad (media aritmética ± 3x desviación estándar) y valorar los resultados obtenidos con las salivas problema.

3.2.4 ANÁLISIS SANGUÍNEO

Las muestras de sangre se tomaron y analizaron en el mismo hospital. La analítica sanguínea que se solicitó a cada participante de nuestro estudio incluía (Tabla 5), además de la hematología y bioquímica completas habituales, el análisis de los

niveles séricos de vitaminas liposolubles (A, D y E) e hidrosolubles (B9 y B12), minerales (Mg, Fe y P) y albúmina, como indicadores de síndromes de malabsorción intestinal de nutrientes.

Tabla 5: Variables analizadas en muestras sanguíneas.

| Marcadores de malabsorción | | Marcadores de infección | |
|----------------------------|--|-------------------------|--|
| Vitaminas liposolubles | Vitamina A Vitamina D Vitamina E | Anticuerpos totales | IgA IgM IgG IgE |
| Vitaminas hidrosolubles | Vitamina B12 Ácido fólico | Proteínas de fase aguda | Proteína C Reactiva Ferritina |
| Minerales | Magnesio Hierro Fósforo | Recuento leucocitario | Neutrófilos Linfocitos Monocitos Eosinófilos Basófilos |
| Proteína sérica | Albúmina | | |

Del mismo modo, se solicitaron los niveles séricos de IgA, IgM, IgG, IgE, y se consideraron junto con los valores de Proteína C Reactiva (PCR), ferritina y el recuento leucocitario, como marcadores de infección/inflamación inespecífica.

3.2.5 PRUEBA DEL ALIENTO O TEST DEL AIRE ESPIRADO

El diagnóstico de la malabsorción de carbohidratos se realizó mediante un método sencillo y no invasivo denominado “Prueba del aliento” o “Test del aire espirado” (Ghoshal, 2011) y que es el empleado en la Unidad de Pruebas Funcionales del hospital para el diagnóstico de malabsorción de azúcares, así como para detectar el sobrecrecimiento bacteriano (SIBO). La prueba se realizó en un primer momento para determinar si la sintomatología gastrointestinal que presentaban los pacientes estaba asociada a la malabsorción de fructosa o lactosa. Las pruebas de sobrecarga oral para cada uno de los azúcares testados se hacían de forma independiente en días diferentes.

Dichas pruebas se repitieron para aquellos pacientes con malabsorción previa y que fueron diagnosticados de parasitosis intestinal, con el fin de valorar la eficacia de la terapia antiparasitaria y dietética-nutricional tras la erradicación de los parásitos.

3.2.5.1 PROCEDIMIENTO TÉCNICO DEL TEST

El metabolismo bacteriano de los carbohidratos produce ácidos grasos volátiles, agua y gases (CO_2 , H_2 y CH_4). La prueba del aliento mide la concentración de hidrógeno (H_2) y metano (CH_4) en el aire exhalado tras la sobrecarga oral con un sustrato azucarado. Los azúcares no absorbidos pasan directamente a colon donde son fermentados por las bacterias dando lugar a hidrógeno y metano. Estos gases pasan a la sangre y llegan al pulmón donde se eliminan mediante el aire espirado haciendo posible la determinación de su concentración en el aliento mediante un cromatógrafo de gases (*QuinTron BreathTrackerTM Digital microlyzer*) (Figura 22, A). El nivel de CO_2 también se mide para corregir la posible contaminación con aire de la habitación, por algún error en el aparato o en la toma de la muestra.

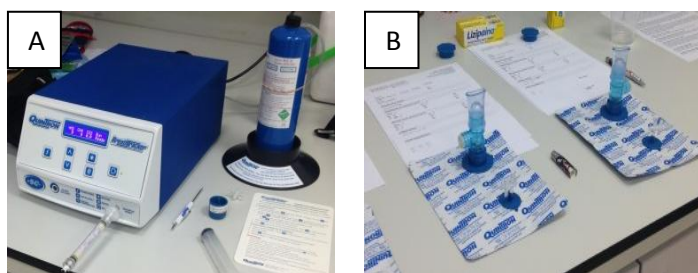


Figura 22: QuinTron BreathTrackerTM Digital microlyzer.

La mitad de las bacterias colónicas productoras de H_2 producen también CH_4 y las que no producen H_2 con los azúcares digeribles producen CH_4 . Asimismo, hay bacterias metanogénicas que transforman el H_2 en CH_4 rápidamente antes de que se elimine en el aliento, por lo que la valoración de la absorción intestinal mediante las concentraciones de gases producidos ha de considerar a ambos para ser correcta. Las bacterias colónicas también metabolizan otros nutrientes produciendo gases:

aminoácidos, mucinas y glicoproteínas de la mucosa intestinal, pero la cantidad de gases que de ello se deriva es mucho menor (Solomons *et al.*, 1983; Hamilton, 1998).

El test del aliento es una prueba ambulatoria, la cual se tiene que llevar a cabo en ayunas y con el seguimiento de una dieta específica el día de antes, como se detalla en el apartado siguiente. El procedimiento consiste en la toma de una primera medida basal del aire espirado en ayunas y tras la dieta sin carbohidratos, administrando previamente un antiséptico oral (Lizipaina®). A continuación, se suministra el sustrato (25 g de lactosa/fructosa disueltos en 250 mL de agua mineral) (Ghosal, 2011; Hinojosa-Guadix *et al.*, 2017) (Figura 23).

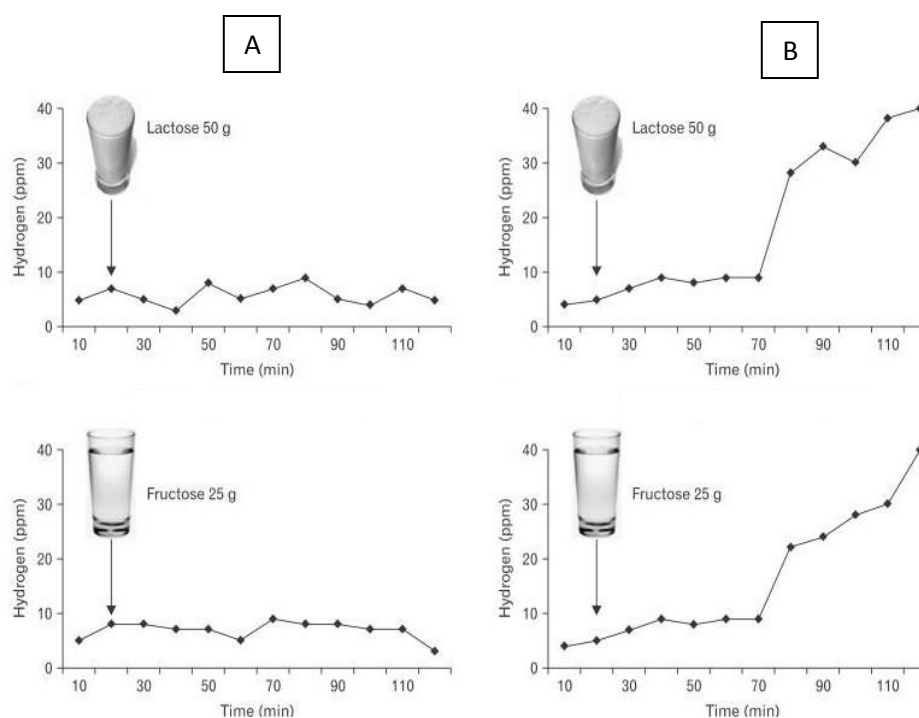


Figura 23: Ejemplos de pruebas del aliento para lactosa y fructosa tras sobrecarga oral con 25 g de sustrato. Evolución de la producción de hidrógeno (ppm: partes por millón) en función del tiempo (min), para una toma de muestra cada 10 min y durante 120 min.

A: negativas; B: positivas (Ghosal, 2011).

Posteriormente, se recoge el aire en una bolsa hermética (Figura 22, B) cada media hora, hasta llegar a las tres horas, y se inyecta en el cromatógrafo de gases para determinar las concentraciones de H₂ y CH₄ puntuales en partes por millón (ppm) producidas por el metabolismo bacteriano de los azúcares no absorbidos.

El nivel basal de H₂ ha de ser menor de 10 ppm, y el de CH₄ menor de 6-8 ppm para que la prueba sea válida y su producción se relacione con el sustrato administrado. Si el nivel basal es mayor de lo esperado, puede ser indicativo de dos situaciones, o sobrecrecimiento bacteriano, exceso de bacterias en parte alta intestinal (recuento bacteriano por encima de 10⁵) que metabolizan el azúcar administrado rápidamente, o la incorrecta realización de la dieta sin carbohidratos del día previo. La prueba se considera positiva cuando en alguno de los puntos de medida se superan los 20 ppm en H₂ del valor basal o el menor de los anteriores, y entre 10-15 ppm en el caso del CH₄ (Hamilton, 1998).

Si se detecta producción de ambos gases, H₂ y CH₄ hay que sumar las dos respuestas para considerar el grado total de malabsorción. Si el total de H₂+CH₄ supera los 15-20 ppm se considera positivo (Hamilton, 1998). Además de las pruebas con valores positivos indicadores de malabsorción de carbohidratos, puede ocurrir que la prueba resulte negativa, por lo que la absorción no está alterada, pero el paciente ha presentado sintomatología (meteorismo, distensión abdominal, diarrea...) durante la prueba de provocación, en este caso se considera que el paciente es intolerante (Hinojosa-Guadix *et al.*, 2017).

3.2.5.2 DIETA SIN CARBOHIDRATOS o “DIETA DEL DÍA DE ANTES”

El día anterior a la prueba se debe realizar una dieta baja en hidratos de carbono y fibra denominada “Dieta del día de antes” (Anexo III). El paciente debe acudir en ayunas al menos durante las 8 horas anteriores a la prueba, aunque lo ideal es que sean 12 horas, y solo podrá tomar agua hasta las 4 horas antes de la realización de la misma. Los alimentos sólidos que no contienen hidratos de carbono y fibra y que, por lo tanto, se pueden tomar el día previo a la prueba, son mayoritariamente todos los que

proceden de animales, carne y sus derivados, huevos, el pescado y derivados. En cuanto a líquidos se permite el agua, el café y el té entre otros.

Por el contrario, los alimentos que no se deben tomar el día anterior por su contenido en hidratos de carbono, tanto simples como complejos, son la leche y los productos lácteos, cereales (arroz, pasta, pan...), los productos de pastelería, los dulces, la mermelada, la fruta, la verdura y los zumos de fruta, los refrescos, los embutidos elaborados industrialmente y los chicles con y sin azúcar. Tampoco puede realizarse la prueba si se han tomado antibióticos, inhibidores de la bomba de protones (omeprazol o similares) o probióticos durante el mes anterior a la prueba.

El objetivo de esta dieta es evitar los alimentos fermentables o parcialmente fermentables, para no proporcionar un sustrato a nuestras bacterias colónicas con el que se puedan aumentar los niveles basales de hidrogeno y metano enmascarando los resultados e invalidando la prueba.

La terapia combinada es aquella que incluye el tratamiento farmacológico antiparasitario, según los fármacos y pautas de elección en función de las especies diagnosticadas, y el tratamiento dietético-nutricional, personalizado y destinado inicialmente a reducir síntomas (Figura 24).

3.2.6 TERAPIA COMBINADA

Esta doble terapia se aplicó a los pacientes con clínica y malabsorción (subgrupo A) que a su vez fueron diagnosticados de parásitos intestinales. Asimismo, a modo de control interno, dentro del subgrupo A, se creó otro grupo con individuos “no parasitados”. A éstos, se les aplicó una terapia simple dietético-nutricional para el manejo de la malabsorción.

Tras un año de intervención, a ambos grupos se les repitieron los test de malabsorción a lactosa y/o fructosa, para valorar el efecto de la terapia recibida sobre la capacidad de absorción intestinal.



Figura 24: Esquema de intervención para valorar la terapia combinada. Tratamientos antiparasitarios y fundamentos del manejo dietético-nutricional.

3.2.6.1 MANEJO DIETÉTICO-NUTRICIONAL DE LA MALABSORCIÓN

A todos los pacientes del subgrupo A, se les realizaron recomendaciones dietético-nutricionales según la intensidad de los síntomas y el tipo de malabsorción que presentaban. Inicialmente, estas recomendaciones estaban encaminadas a suprimir o limitar la fructosa o lactosa de la dieta para mejorar los síntomas referidos por el paciente en la entrevista realizada el primer día del estudio. El manejo dietético-nutricional consistió en restringir o disminuir el aporte de la fructosa o lactosa

dietética, para posteriormente pasado un tiempo, y una vez el paciente hubiese mejorado la sintomatología que refería en la anamnesis inicial, reintroducirlos de nuevo para de forma paulatina recobrar la absorción. En los casos de pacientes con malabsorción y parasitados, la reintroducción de fructosa o lactosa se hacía una vez ya eliminado el parásito. En el caso de los pacientes que no tenían parásitos el objetivo era el mismo, siguiendo las mismas pautas dietéticas que los parasitados, aunque en dichos sujetos no fuera la parasitosis la causa primera de su malabsorción. Para realizar este procedimiento se siguieron las recomendaciones realizadas por un grupo de investigadores australianos de la Universidad de Monash en Melbourne (2008), en el que decían que los hidratos de carbono fermentables, “*Oligosacáridos, monosacáridos, disacáridos i polioles fermentables*” (FODMPAs) de la dieta actuaban como causantes de síntomas en determinados pacientes con patologías gastrointestinales (Zugasti *et al.*, 2016). Los FODMPAs son carbohidratos de cadena corta que incluyen; fructosa (cuando se consume en cantidades excesivas en relación a la glucosa), lactosa, fructanos y galacto-oligosacáridos. Según estos investigadores, estos hidratos de carbono son capaces, en personas susceptibles, de producir síntomas gastrointestinales como la distensión abdominal secundaria a un efecto osmótico y rápida fermentación (Chahuán *et al.*, 2016). Por tanto, lo que planteaba este grupo de investigadores era eliminar de la dieta los siguientes alimentos: Frutas, verduras, hortalizas, legumbres, cereales como el trigo, cebada, avena y centeno, frutos secos, lácteos, bebidas refrescantes, misceláneas dulces y algunos edulcorantes. Esta restricción se debía hacer durante 2 meses, para posteriormente introducirlos progresivamente de nuevo en la dieta (Huamán *et al.*, 2014).

Para casos concretos de pacientes en los que se había detectado algún déficit vitamínico o mineral a nivel analítico, se valoraba la posibilidad de suplementar la dieta. La suplementación estaba supervisada por el equipo médico de la Unidad de Endocrinología y Nutrición del Hospital la Fe. El tiempo y duración de la suplementación se valoraba según las analíticas posteriores.

3.2.6.2 TRATAMIENTOS ANTIPARASITARIOS

El tratamiento antiparasitario lo pautaba el equipo médico del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital la Fe de Valencia según los tratamientos antiparasitarios recomendados por *The Medical Letter On Drugs and Therapeutics, Drug for Parasitic Infections* (Abramowicz *et al.*, 2007; Abramowicz, 2013) (Tabla 6).

Tabla 6: Tratamientos antiparasitarios recomendados por *The Medical Letter*.

| Parásito | Fármacos | Dosis Adultos |
|-----------------------------|--------------|--|
| <i>G. intestinalis</i> | metronidazol | 250 mg vía oral, 3 veces al día, 7 días |
| | tinidazol | 2 g en dosis única |
| | nitazoxanida | 500 mg vía oral, dos veces al día, 3 días |
| <i>Blastocystis</i> sp. | metronidazol | 750 mg vía oral, 3 veces al día, 10 días |
| <i>Cryptosporidium</i> spp. | nitazoxanida | 500 mg vía oral, 2 veces al día, 3 días |
| <i>Endolimax nana</i> | metronidazol | 250 mg vía oral, 3 veces al día, 7 días |
| <i>Entamoeba coli</i> | paramomicina | 25-35 mg/kg/día, repartida en 3 dosis, 5-10 días |

Para complementar el tratamiento farmacológico, de forma personalizada, se valoraba la posibilidad de la toma de simbióticos (probióticos y prebióticos) junto con el tratamiento pautado, para minimizar el impacto de los antiparasitarios en la microbiota del paciente y los efectos gastrointestinales secundarios generados por el fármaco. El simbiótico que se usó fue (Lactibiane Tolerance®), ya que estaba libre de gluten y lactosa, y era compatible con la mayoría de pacientes del estudio. La recomendación fue que tomarán 1 comprimido del simbiótico al día durante el tiempo de toma del fármaco y hasta una semana después de la finalización del antiparasitario.

3.2.7 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este estudio ha sido financiado por dos proyectos propios de la Convocatoria de Ayudas a la Investigación del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (código: 2014/0396 y código: 2015/0359) previa aprobación por parte del CEIB (Comité Ético de Investigación Biomédica) del propio instituto con fechas 07/10/2014 y 07/04/2015 (Anexos IV y V).

3.2.8 MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Los datos analíticos para el análisis descriptivo de la muestra inicial y de la muestra incluida en la valoración de la terapia combinada, se resumieron mediante media (desviación estándar) y mediana (primer y tercer cuartil) en el caso de variables continuas como la edad de los participantes en el estudio y los resultados de las analíticas sanguíneas para la mayoría de los parámetros analizados.

Para el análisis de variables categóricas se han empleado frecuencias absolutas y relativas, como en el caso del sexo, porcentajes de parasitación, casos de malabsorción, sintomatología gastrointestinal, factores de riesgo de parasitosis y comparación de la eficacia de los métodos diagnósticos empleados.

La asociación entre la presencia de parásitos y la malabsorción de fructosa o lactosa se estudió mediante modelos de regresión logística en los que se incluyeron la presencia

de comorbilidades y la edad como covariables. De todos estos modelos se obtuvieron OR (*Odds Ratio*) ajustados para la presencia de parásitos, así como estimaciones de los intervalos de confianza al 95% para esos OR. Se analizó de este modo la relación entre la presencia de parásitos y la presencia de malabsorción simple o combinada, para después analizar la relación respecto a cada una de las malabsorciones de forma individualizada. Como último análisis, se evaluó la relación entre la presencia de *Giardia* o *Blastocystis* con los diferentes tipos de malabsorción por separado, considerando que afectan a diferentes zonas del intestino y que esto puede influir en su papel patógeno.

Como parte del análisis comparado de la eficacia de los métodos diagnósticos para *G. intestinalis*, se contrastó la concordancia entre los resultados obtenidos mediante los métodos de determinación ELISA indirecto y PCR a tiempo real. Para ello, se calculó una matriz de confusión entre ambos métodos y se determinó el índice Kappa de Cohen, así como estimaciones de los intervalos de confianza al 95%.

Para estudiar los parámetros analíticos obtenidos, marcadores de absorción (vitaminas y minerales), marcadores de infección/inflamación (inmunoglobulinas, proteína C reactiva, recuento leucocitario) y marcadores de anemia (hemoglobina, hematocrito y hematíes), se han utilizado modelos de regresión lineal múltiple. Los valores de las distintas vitaminas y minerales, se representaron mediante un mapa de calor o "heatmap" en el que se visualizaron de forma global posibles diferencias entre el grupo de pacientes (grupo P) y el grupo de controles (grupo C); entre los subgrupos de pacientes (subgrupo A y B) y, dentro de cada subgrupo, entre parasitados/no parasitados de forma general o por especie parásita concreta (*Giardia* o *Blastocystis*). Adicionalmente, se estudió cada vitamina por separado mediante una representación de diagrama de cajas y un test de Wilcoxon. Las correlaciones entre los comportamientos analíticos de los diferentes nutrientes (vitaminas y minerales) analizados se estudiaron mediante una matriz de correlaciones de Pearson. Respecto a la relación entre tener o no parásito, tener o no *Giardia* o *Blastocystis*, según al grupo (P o C) o subgrupo (A o B) al que se perteneciese y los valores analíticos obtenidos

para cada nutriente, se realizó un modelo de regresión lineal con una interacción entre parásito y grupo. Dada la presencia de heterocedasticidad en ese modelo, se amplió el mismo modelizando también la estructura de la varianza mediante mínimos cuadrados generalizados. Del mismo modo se procedió para estudiar el resto de marcadores de las analíticas citados anteriormente.

El estudio de la identificación de factores de riesgo de parasitosis entre los pacientes parasitados se estudió mediante modelos de regresión logística. De cada hábito o situación personal valorado se obtuvo el OR ajustado para la presencia de parásitos, así como estimaciones de los intervalos de confianza al 95% para esos OR.

Finalmente, se valoró el efecto del tratamiento sobre los pacientes respecto a la evolución de la malabsorción mediante un modelo de regresión ordinal mixto incluyendo al individuo como factor aleatorio para controlar la no independencia de las medidas pre y post intervención terapéutica.

Los p-valores inferiores a 0,05 fueron considerados como significativos en cada uno de los análisis realizados y de cada estimación realizada se calculó el intervalo de confianza al 95%.

Todos los análisis se realizaron mediante el software R (versión 3.4.3) y los paquetes de R ordinal (versión 2018.8-25), NMF (versión 0.21), clickR (versión 0.4.05) y nlme (versión 3.1-135), con el apoyo de la Unidad de Bioestadística del Instituto de Investigación Sanitaria de la Fe.

CAPÍTULO CUARTO

RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

A lo largo del estudio se analizaron un total de 351 individuos, de los cuales 269 fueron pacientes con sintomatología gastrointestinal (“grupo P”), junto con 82 individuos sanos como control (“grupo C”). El grupo de pacientes lo conformaron 209 mujeres y 60 hombres con un intervalo de edad comprendido desde los 25 a los 64 años y una edad media de 43,9 años. Para el grupo C, se reclutaron 58 mujeres y 24 hombres y la media de edad fue de 32 años, con una edad mínima de 19 años y máxima de 45 años.

Tal y como se muestra en la Tabla 7, el grupo de pacientes sintomáticos se dividió en dos subgrupos: a) “subgrupo A”, con malabsorción a lactosa o fructosa, y b) “subgrupo B” con síntomas, pero con el test del aliento negativo, es decir con absorción normal de carbohidratos.

Tabla 7: Características de los pacientes al ingreso en el estudio.

| | | Subgrupo A (n=213) | Subgrupo B (n=56) |
|------------------------------|---|-----------------------|----------------------|
| Sexo | Femenino, n (%) | 172 (80,8%) | 37 (66,1%) |
| | Masculino n (%) | 41 (19,2%) | 19 (33,9%) |
| Edad | Años (media) | 40,5 | 47,4 |
| | mínimo-máximo | 29-55 | 30-64 |
| Malabsorción | Fructosa, n (%) | 171 (80,3%) | - |
| | Lactosa, n (%) | 127 (59,6%) | - |
| | Combinada, n (%) | 84 (39,4%) | - |
| Síntomas intestinales | Diarrea | 204 (95,8%) | 50 (89,3%) |
| | Estreñimiento | 112 (52,6%) | 22 (39,3%) |
| | Distensión abdominal (EVA >5) | 197 (92,5%) | 49 (87,5%) |
| | Flatulencia (EVA >5) | 203 (95,3%) | 51 (91,1%) |
| Comorbilidades | | 31 (14,6%) | 5 (8,9%) |
| | Síndrome de Intestino Irritable, n (%) | 22 (10,3%) | 7 (39,2%) |
| | Enfermedad Inflamatoria Intestinal, n (%) | 5 (2,4%) | - |
| | Enfermedad Celíaca, n (%) | 6 (2,8%) | - |

El subgrupo A, con malabsorción, lo formaron 213 individuos, 172 mujeres y 41 hombres, con una edad media de 40,5 años. Entre ellos, la malabsorción de fructosa fue la más frecuente con un 80,3% de los casos; asimismo, se diagnosticó un 59,6% de casos con malabsorción a lactosa. Además, 84 pacientes fueron positivos para ambas pruebas (39,4%), por lo que combinaban la malabsorción de ambos azúcares. El otro subgrupo de pacientes, sin problemas en la absorción, lo constituyeron 37 mujeres y 19 hombres, con una edad media de 47,4 años.

En ambos grupos se registraron síntomas gastrointestinales crónicos. En cuanto a la alteración del hábito intestinal, se detectó un predominio de las deposiciones diarreicas en ambos casos, pero más frecuente en los casos de malabsorción. Asimismo, en ambos grupos resultaron frecuentes los casos de distensión abdominal, 92,5% en el subgrupo A, y 87,5% en el subgrupo B. En cuanto a las flatulencias, también fueron valoradas con puntuaciones altas, 95,3% en el subgrupo A y 91,1% en el subgrupo B. En la tabla 7 se registran los casos con puntuaciones superiores a 5 según la evaluación subjetiva que realizaron los pacientes mediante la escala EVA.

Por último, al revisar la historia clínica se consultaba sobre posibles comorbilidades, consideradas como tales aquellas patologías intestinales crónicas que pueden ser responsables de síndromes de malabsorción como son el Síndrome de Intestino Irritable (SII), las Enfermedades Inflammatorias Intestinales (EII) y la Enfermedad Celíaca (EC). Los pacientes con malabsorción presentaron un mayor porcentaje de comorbilidades (14,6%), sobre todo en forma de Síndrome de Intestino Irritable (10,3%), Enfermedad Celíaca (2,8%) y de Enfermedad Inflammatoria Intestinal (2,4%).

4.2 PREVALENCIA DE PARASITACIÓN Y ESPECTRO PARASITARIO

Tras el análisis parasitológico completo, que se detallará más adelante, se obtuvo una prevalencia parasitación entre los pacientes del 39,8% (107/269) frente a un 14,6% (12/82) en el grupo control. Se han detectado casos de co-infección parasitaria solo

entre los pacientes con sintomatología, con una prevalencia general del 6,3% (17/269), y casos de multiparasitismo doble (0,06%) y triple (0,007%).

4.2.1 PREVALENCIA DE PARASITACIÓN EN FUNCIÓN DEL SEXO, LA EDAD Y EL GRUPO DE ESTUDIO

Si analizamos la frecuencia de parasitación en función del subgrupo dentro de los pacientes sintomáticos, en aquellos casos con malabsorción (subgrupo A) la prevalencia resultó ser la más elevada, se diagnosticaron 89 casos positivos (41,8%). En el subgrupo B, se obtuvo un total de 18 parasitados (32,1%), y 12 en el grupo control (14,6%).

Entre los pacientes parasitados del estudio se analizó la distribución de casos en función del sexo y la edad. En relación al sexo, la prevalencia de parasitación es prácticamente la misma en ambos sexos, 34,5% (92/267) para el sexo femenino y 32,1% (27/84) para el sexo masculino. Para analizar la distribución de casos en función de la edad, y teniendo en cuenta que se trata de población de adulta, se establecieron 3 intervalos de edad: a) de 18-39; b) de 40 a 59 y; c) de 60 a 75 años. Más de la mitad de los casos positivos se encuentran en el primero de los grupos, con un 53,8% (64/119), seguido de los mayores de 40 hasta 59 años con un 34,5% (41/119). El número de casos para el tercer intervalo de edad resultó ser reducido (11,8%), pero se trata del que menos representación tienen entre los participantes.

En cuanto a las especies parásitas diagnosticadas en el conjunto de casos, se trata en todos los casos de protozoos y unicelulares intestinales de las especies: *Giardia intestinalis*, *Blastocystis* sp., *Cryptosporidium parvum*, *Endolimax nana*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni* y *Iodamoeba butschlii*. No se diagnosticó ningún caso de helmintiasis. Para el diagnóstico de *G. intestinalis*, y como se detallará en apartado siguiente, se combinó la microscopía óptica de heces concentradas con métodos moleculares de detección de antígenos en heces, y de anticuerpos específicos (IgA) en saliva. El resto de especies parásitas se diagnosticaron exclusivamente por microscopía.

En la Tabla 8 se muestra la prevalencia comparada entre pacientes y controles, y la distribución de casos según la especie parásita, de mayor a menor frecuencia.

Tabla 8: Prevalencia de parasitosis por especie parásita y grupo de estudio.

| Especies parásitas | Pacientes | | Controles | |
|-------------------------|-----------|------|-----------|------|
| | n | % | n | % |
| <i>G. intestinalis</i> | 66 | 24,5 | 1 | 1,2 |
| <i>Blastocystis</i> sp. | 34 | 12,6 | 11 | 13,4 |
| <i>E. nana</i> | 3 | 1,1 | 0 | 0,0 |
| <i>E. coli</i> | 3 | 1,1 | 0 | 0,0 |
| <i>E. hartmanni</i> | 3 | 1,1 | 0 | 0,0 |
| <i>C. parvum</i> | 2 | 0,7 | 0 | 0,0 |
| <i>I. butschlii</i> | 1 | 0,4 | 0 | 0,0 |

G. intestinalis es el protozoo patógeno más frecuente en el grupo de pacientes (24,5%), habiéndose diagnosticado un único caso entre los controles (1,2%). Sin embargo, en el caso de *Blastocystis* la situación que revelan los resultados es diferente, las prevalencias entre pacientes y controles son muy similares, 12,6% y 13,4%, respectivamente. Del resto de especies destacar los 2 casos de *C. parvum* como parásito patógeno. Las especies de las amebas intestinales *E. nana*, *E. coli*, *E. hartmanni* y *I. butschlii* se consideran de menor relevancia clínica, y además todas ellas han sido diagnosticadas en forma de multiparasitismo, doble y triple, dentro del grupo de estudio.

La asociación parasitaria más frecuente ha sido la co-infección entre *G. intestinalis* y *Blastocystis* sp. en 9 de los casos positivos (3,5%). Asimismo, se han combinado en forma de multiparasitismo doble, *Giardia* con *E. nana* en 2 casos (0,7%), y un caso con *E. coli* (0,4%); y *Blastocystis* con *E. nana* (0,7%) en dos ocasiones, y con *E. coli* (0,4%) en una ocasión. La infección por tres especies parásitas solo se registró en dos

pacientes, uno de ellos combinando *G. intestinalis*, *Blastocystis* sp. y *Entamoeba coli*, y otro caso combinando *E. hartmanni*, *E. nana* y *I. butschlii*.

Al analizar la prevalencia de parasitación y las especies más frecuentes entre los pacientes en función de su capacidad de absorber carbohidratos o no, subgrupo B y A, respectivamente, se obtuvieron los resultados que se muestran la Figura 25.

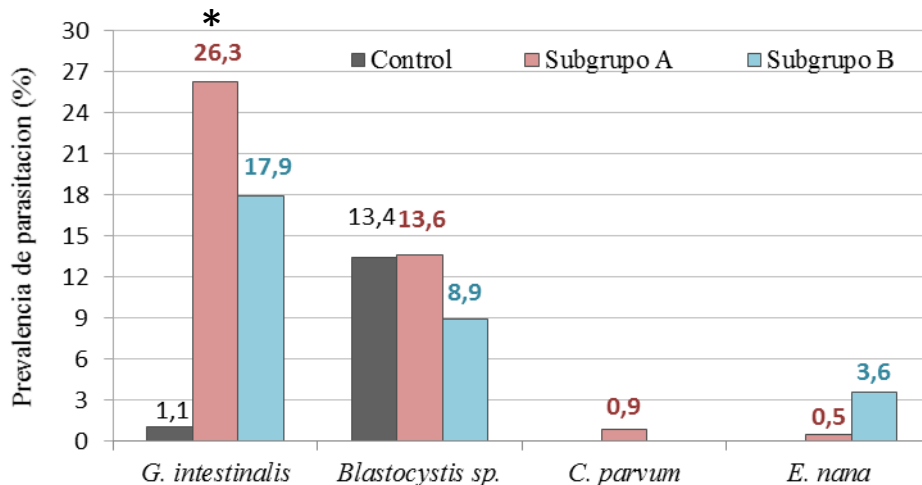


Figura 25: Prevalencia de parasitación por especie parásita y grupo de estudio. Los datos significativos respecto al control se indican con asteriscos (*) ($p < 0,05$).

Los porcentajes de parasitación varían en función de la especie parásita y el grupo analizado. Entre los 213 pacientes con malabsorción y clínica gastrointestinal del subgrupo A predomina la infección por *G. intestinalis*, obteniéndose la mayor de las prevalencias con un 26,3% (56/213), superando a la detectada en pacientes con pruebas de malabsorción negativas con un 17,9% de parasitación (10/56), y muy por encima de los individuos sanos con un 1,1% (1/82). La prevalencia de *G. intestinalis* en el subgrupo A de pacientes con malabsorción resultó estadísticamente significativa respecto al control ($\chi^2=19,7$; $p < 0,001$). Sin embargo, al analizar de forma individual los casos positivos de *Giardia*, no se halló relación significativa, ni con el sexo, ni con la edad. La segunda especie más prevalente entre los pacientes ha resultado *Blastocystis* sp., ligeramente superior en el subgrupo con malabsorción (13,6%,

29/213) respecto a los del subgrupo B (8,9%, 5/56), pero con unos datos muy próximos a los de los individuos sanos (13,4%, 11/82), por tanto, sin diferencias significativas entre grupos. Por último, la especie *C. parvum* (0,9%) se detectó exclusivamente en dos casos con clínica asociada a malabsorción, y los casos de *E. nana* se dieron por igual en los pacientes de ambos subgrupos, sin diferencias significativas entre ellos.

4.2.2 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA *G. intestinalis*

Con el fin de optimizar el diagnóstico de *Giardia* entre los participantes en el estudio teniendo en cuenta que se trata de pacientes adultos con problemas gastrointestinales crónicos, y con la ya citada intermitencia del parásito en la eliminación de formas de resistencia al medio, se combinaron métodos convencionales con métodos moleculares para evitar, en la medida de lo posible, los falsos negativos. Se consideraba como un caso de giardiosis si se obtenía un resultado positivo en al menos una de las tres pruebas empleadas.

En primer lugar, se realizó a la muestra de heces frescas de cada participante una inmunocromatografía (ICT) comercial para la detección específica y simultánea de antígenos de los protozoos *C. parvum*, *G. intestinalis* y el complejo *Entamoeba* (Simple *Crypto-Giardia-Entamoeba*, Operon®). El test reveló 10 casos positivos de *G. intestinalis* entre las 351 muestras analizadas (2,8%) (Tabla 9).

Tabla 9: Métodos diagnósticos empleados combinados para *G. intestinalis*.

| | HECES | | SALIVA |
|-----------------------|-------------|-------------|-----------------|
| | ICT | MO | ELISA indirecto |
| Positivo (69) | 10 (2,8%) | 17 (4,8%) | 62 (17,7%) |
| Negativo (282) | 341 (97,2%) | 334 (95,2%) | 289 (82,3%) |

Continuando con el análisis coprológico, se concentraron mediante Ritchie modificado las tres muestras de heces para analizarlas por microscopía óptica en busca de quistes de *G. intestinalis*. Este segundo análisis reveló 7 casos positivos más que los diagnosticados con el método inmunocromatográfico rápido, un total de 17 (4,8%). Todos aquellos casos positivos detectados por ICT, también lo fueron por microscopía. Para completar el análisis se combinaron los métodos directos anteriores, con un método de diagnóstico indirecto para la detección de anticuerpos específicos IgA secretora anti-*Giardia* en saliva, un enzimoimmunoanálisis de tipo ELISA indirecto. De esta forma, se evitaría la falta de sensibilidad de los métodos directos relacionada con la baja o nula emisión de formas de resistencia en heces en las infecciones crónicas por *G. intestinalis*. La IgAs se encuentra elevada en saliva mientras la infección está activa, independientemente del momento del ciclo vital en el que se encuentre el protozoo, por lo tanto, no está sometida a periodos de intermitencia. Con este método se obtuvo un total de 62 casos positivos, una prevalencia del 17,7%. La totalidad de los casos positivos detectados por ICT o microscopía coincidieron con valores de IgAs aumentada, pero además hubo una elevada proporción de pacientes con pruebas directas negativas y con resultados de anticuerpos positivos.

Por último, para tratar de mejorar aún más la sensibilidad del diagnóstico, teniendo en cuenta que los métodos directos no habían resultado muy sensibles, y que existe la posibilidad de fallos en los métodos de detección de anticuerpos (periodo de la infección, déficit selectivo de IgA, fallo en la toma o conservación de la muestra...) se estudió la aplicabilidad de una última técnica para detectar ADN de *Giardia* en heces, la reacción en cadena de de la polimerasa (PCR) a tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR). Dicha técnica es una interesante alternativa a los métodos convencionales debido a su rapidez y a su elevada sensibilidad y especificidad; asimismo proporciona una cuantificación continua y precisa del ADN que se va formando (Klein, 2002; Balsalobre-Arenas & Alarcón-Cavero, 2017).

Tal y como muestra la Tabla 10, se tomaron muestras de heces de 19 pacientes positivos y 13 de pacientes negativos según los resultados de ELISA de saliva frente a *G. intestinalis* para ser analizadas por qPCR. Los resultados de la qPCR confirmaron 14 de los 19 casos positivos y 10 de los 13 casos negativos.

Tabla 10. Comparación de resultados con ELISA indirecto y qPCR.

| | | ELISA indirecto | | |
|------|---|-----------------|----------|----|
| | | Positivo | Negativo | |
| qPCR | + | 14 | 3 | 17 |
| | - | 5 | 10 | 15 |
| | | 19 | 13 | 32 |

La tasa bruta de concordancia, probabilidad de que coincidan los resultados de ambas pruebas, fue de 24/32, es decir del 75%. Al calcular el *Coefficiente kappa de Cohen* (medida estadística que ajusta el efecto del azar en la proporción de la concordancia observada para elementos cualitativos) que corrige los resultados de concordancia descontando las posibles concordancias al azar nos dió un “coeficiente κ ” de 0,5 [IC: 0,19-0,79], indicativo de una concordancia entre los tests moderada (50%). Los fallos de concordancia falsos negativos (3), podrían deberse a la degradación de los anticuerpos de la muestra, por déficit inmunológico de IgA secretora o por toma incorrecta o mantenimiento inadecuado. Los falsos positivos de saliva (5) pueden estar relacionados con una falta de emisión del ADN del parásito en heces o una muy baja carga parasitaria, o bien por degradación o inhibición de la Taq polimerasa (Tabla 10).

4.3 ALTERACIONES ANALÍTICAS EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

El análisis sanguíneo que se solicitó a cada participante del estudio, además de la hematología y bioquímica, analizaba los niveles séricos de vitaminas liposolubles (A,

D y E) e hidrosolubles (B9 y B12), minerales (Mg, Fe y P), como marcadores de absorción intestinal. Del mismo modo, se analizaron los niveles totales de anticuerpos IgA, IgM, IgG, IgE, así como de la Proteína C Reactiva (PCR) y la ferritina, los cuales, junto con el recuento leucocitario, se consideran marcadores de infección/inflamación inespecífica.

Con el fin de realizar un análisis más detallado, se tabularon y analizaron los datos teniendo en cuenta el grupo y subgrupo al que pertenecía cada participante para poder establecer comparaciones entre ellos. Así, comparamos en primer lugar los datos obtenidos entre los pacientes o sintomáticos (grupo P) y los sanos o controles (grupo C), para en un segundo análisis desglosar el grupo de pacientes en el subgrupo A (con síntomas gastrointestinales y con malabsorción) y el subgrupo B (con síntomas gastrointestinales, sin malabsorción). En primer lugar, se realizó un análisis descriptivo de la muestra, comparando entre medias y desviaciones típicas (standard deviation (SD)), medianas y 1º/ 3º cuartil (Q) (más correcta para aquellos parámetros con valores puntuales muy extremos), entre los diferentes marcadores estudiados.

4.3.1 MARCADORES DE ABSORCIÓN INTESTINAL: VITAMINAS Y MINERALES

Para iniciar el estudio de las alteraciones analíticas se realizó un análisis descriptivo exploratorio de la muestra comparando los resultados para las vitaminas y los minerales entre los pacientes y los controles, a nivel de medias y medianas (Tabla 11). En esta primera visión global se pueden observar ligeras variaciones en los datos analíticos generales, entre los pacientes y los controles, principalmente en el grupo de las vitaminas.

Para la **vitamina A**, se pueden observar valores menores, tanto para la media como la mediana, en el grupo de pacientes con respecto al grupo control, pero en ambos casos se encuentran dentro del rango de referencia para esta variable.

Tabla 11: Valores descriptivos de vitaminas y minerales para pacientes y controles.

| MARCADORES DE ABSORCIÓN INTESTINAL | CONTROLES | PACIENTES | RANGOS DE REFERENCIA |
|------------------------------------|---|--|----------------------|
| | Media (SD) Mediana (1°/3°Q) | Media (SD) Mediana (1°/3°Q) | |
| Vitaminas LIPOSOLUBLES: | | | |
| A | 51,3 (10,1) 50 (46/56) | 47,1 (12,6) 46 (39/54) | (42-68) µg/dL |
| E | 12,7 (3,0) 12,6 (11,2/14,6) | 12,9 (3,5) 12,6 (10,4/15,2) | (8,6-13) µg/mL |
| D | 28,6 (8,81) 29,2 (21,7/34,2) | 24,7 (9,9) 23,5 (18,5/28,9) | (30-65) ng/mL |
| Vitaminas HIDROSOLUBLES: | | | |
| B12 | 447,1 (144,2) 463 (353,5/554,5) | 435,1 (193,4) 399 (324/502) | (200-900) pg/dL |
| ÁCIDO FÓLICO (B9) | 7,47 (3,6) 6,9 (4,8/8,8) | 7,63 (5,1) 5,8 (4,6/8,5) | (3-17) ng/mL |
| Minerales: | | | |
| MAGNESIO | 2,2 (0,3) 2,2 (2,0/2,2) | 2,1 (0,2) 2,1 (2,0/2,2) | (1,7-2,7) mg/dL |
| HIERRO | 84,9 (32,7) 85 (60,5/109,5) | 90,1 (39,8) 85 (63,5/112) | (39-147) µg/dL |
| FÓSFORO | 3,4 (0,6) 3,5 (3,0/3,9) | 3,6 (0,6) 3,5 (3,2/4) | (2,7-4,5) mg/dL |

En el caso de la **vitamina D**, llama la atención que se obtienen valores por debajo del rango de referencia en ambos grupos de estudio, ya que se esperaban valores por encima del rango de referencia para el grupo control, puesto que no deberían tener en principio comprometida su absorción, y de nuevo los valores medios son más bajos aun en el grupo de pacientes.

En relación a las vitaminas hidrosolubles, también aparece la tendencia al déficit entre los pacientes del estudio, con medianas inferiores a las del control tanto para la

vitamina B12 como la **vitamina B9**, sin embargo, no se encuentran en niveles patológicos; en ambos casos están dentro de rango normal.

En el grupo de los **minerales**, magnesio, hierro y fósforo, no se observan diferencias entre los distintos grupos de estudio: en el caso del hierro y del fósforo las medianas coinciden. Cuando se comparan los niveles de magnesio se obtienen valores de media y mediana muy similares.

En un segundo análisis se evaluaron los datos teniendo en cuenta los subgrupos de pacientes a los que pertenecían los pacientes, en función de si presentaban malabsorción asociada a la clínica gastrointestinal (subgrupo A), o no (subgrupo B). Como se puede observar en la Tabla 12, y como ya ocurría en el primer análisis, aparecen valores más heterogéneos en el apartado de las vitaminas.

Para las liposolubles, en el caso de la **vitamina A** los valores de media y mediana para el subgrupo A son menores que para el resto de grupos. Sin embargo, los valores de los tres grupos se mantienen dentro del rango de referencia para esta vitamina. En el caso de la **vitamina D** todos los valores se encuentran por debajo de los de referencia independientemente del grupo, siendo inferiores para pacientes.

Como se reflejaba en el primer análisis los valores de **vitamina B12** y **vitamina B9** son inferiores a los del control, en concreto la vitamina B12 alcanza su menor valor medio en el subgrupo B, y la vitamina B9 la menor de las medianas en el subgrupo A.

En el grupo de los **minerales** y siguiendo con la tendencia del primer análisis, no se hallan diferencias entre las medias y medianas, además de mantenerse todos los valores dentro de los rangos de referencia establecidos.

Tabla 12: Valores descriptivos de vitaminas y minerales para los subgrupos de estudio.

| MARCADORES ABSORCIÓN INTESTINAL | CONTROLES | SUBGRUPO A | SUBGRUPO B | RANGOS DE REFERENCIA |
|---------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| | Media (SD) Mediana (1°/3°Q) | Media (SD) Mediana (1°/3°Q) | Media (SD) Mediana (1°/3°Q) | |
| Vitaminas LIPOSOLUBLES: | | | | |
| A | 51,3 (10,1) | 46,6 (12,8) | 49,1 (11,8) | (42-68) µg/dL |
| | 50 (46/56) | 45 (38/54) | 48 (40,8 /55,3) | |
| E | 12,7 (3,0) | 12,8 (3,4) | 13,1(3,8) | (8,6-13) µg/mL |
| | 12,6 (11,2/14,6) | 12,4 (10,5/15,1) | 12,9 (10,1/15,4) | |
| D | 28,6 (8,81) | 25,5 (10,1) | 21,6 (8,9) | (30-65) ng/mL |
| | 29,2 (21,7/34,2) | 24,2 (19,5/30,1) | 20,9 (15,1/26,6) | |
| Vitaminas HIDROSOLUBLES: | | | | |
| B12 | 447,1 (144,2) | 452,7(196,9) | 369,3 (165,4) | (200-900) pg/dL |
| | 463 (353,5/554,5) | 402 (341/526,3) | 372 (258/438) | |
| B9 | 7,47 (3,6) | 7,6 (5,1) | 8,3 (4,9) | (3-17) ng/mL |
| | 6,9 (4,8/8,8) | 5,6 (4,6/8,4) | 6,9 (4,5/12,4) | |
| Minerales: | | | | |
| MAGNESIO | 2,2 (0,3) | 2,1 (0,2) | 2,1 (0,1) | (1,7-2,7) mg/dL |
| | 2,2 (2,0/2,2) | 2,1 (1,9/2,2) | 2,1 (1,9/2,2) | |
| HIERRO | 84,9 (32,7) | 89,8 (40,2) | 90,8 (38,7) | (39-147) µg/dL |
| | 85 (60,5/109,5) | 85,5 (63/111,5) | 85 (67/112) | |
| FÓSFORO | 3,4 (0,6) | 3,6 (0,6) | 3,5 (0,6) | (2,7-4,5) mg/dL |
| | 3,5 (3,0/3,9) | 3,6 (3,2/4) | 3,5 (3,1/3,9) | |

Para aquellos valores en los que se detectaron alteraciones en la fase descriptiva anterior se realizó un estudio más detallado de los resultados obtenidos por grupos y subgrupos acompañados de un análisis estadístico. En este análisis también se tendrá en cuenta como variable el estar parasitado o no, incluso la especie parásita, para

evaluar el posible efecto de su presencia y las consecuencias sobre los parámetros analíticos.

4.3.1.1 Vitamina A

En el análisis inicial se apreciaba una tendencia al déficit de vitamina A en el grupo de pacientes. Se calculó el porcentaje de valores bajos de esta vitamina, dentro de cada grupo y subgrupo, al compararlos respecto a los rangos de referencia para valorar con qué frecuencia se observa este déficit (Figura 26). En el subgrupo A se detectó el mayor porcentaje de sujetos con déficit, siendo de un 40%, y un tanto inferior (30%) para el subgrupo B; en ambos casos esta alteración resultó más frecuente que en los controles (12%).

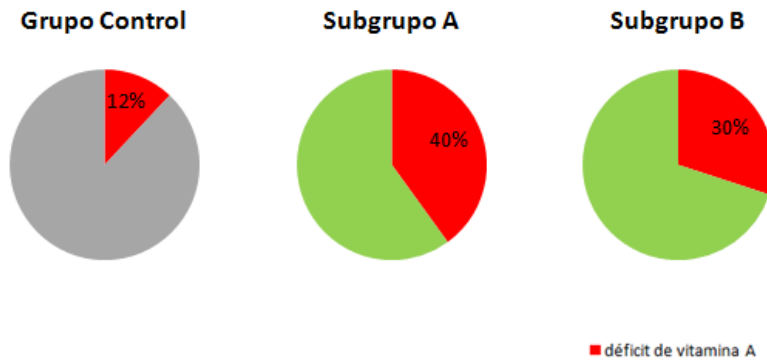


Figura 26: Frecuencia de sujetos con déficit de vitamina A respecto a los rangos de referencia en función del grupo o subgrupo de estudio.

Por otro lado, se representaron los valores analíticos individuales de vitamina A ($\mu\text{g/dL}$) (en diagramas de cajas y se obtuvo la Figura 27. En dicha figura se ha representado en verde, los valores del rango de referencia, y en negro, la mediana para cada grupo y subgrupo. Se aprecia claramente que cuando hay síntomas las medianas son inferiores al control, con mayor número de casos de deficiencia en los que además de clínica tienen malabsorción (subgrupo A).

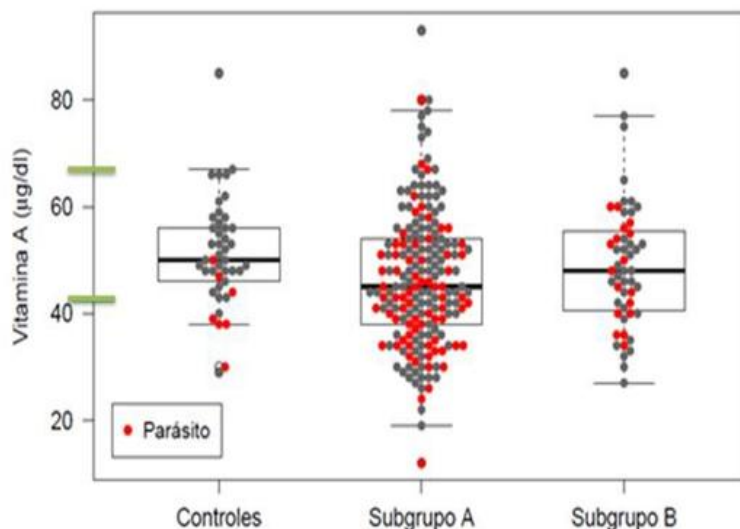


Figura 27: Valores de vitamina A individuales por grupo y subgrupo. Rango de referencia líneas verdes en eje de ordenadas.

Para comprobar si las diferencias que se apreciaban en la Figura 27 eran significativas se realizó una regresión lineal con modelización de la estructura de la varianza para los valores individuales y comparando entre controles y los subgrupos. De esta forma, se obtuvieron unos valores (estimación del efecto de pertenecer a un grupo/subgrupo concreto) para los pacientes con malabsorción del subgrupo A de -4,7 puntos, con respecto al grupo control ($p=0,013$), lo cual indica que los valores de estos pacientes son deficitarios respecto a los controles, los valores analíticos no diferían en su conjunto de forma significativa respecto a los de los controles ($p=0,455$).

Continuando con el análisis dentro del subgrupo A, en el cual las diferencias han resultado ser estadísticamente significativas, se llevó a cabo un estudio del efecto de la parasitación sobre los niveles séricos de vitamina A. Se analizaron los resultados de las analíticas teniendo en cuenta si estaba parasitado o no cuando se les realizó el análisis. En primer lugar, se calculó la frecuencia de déficit de vitamina A en función de los rangos, y resultó ser mayor para los casos de pacientes parasitados (52%) respecto a los no parasitados (33%).

Al comparar los valores absolutos de cada situación (Figura 28) se evidenció una mediana inferior para los parasitados.

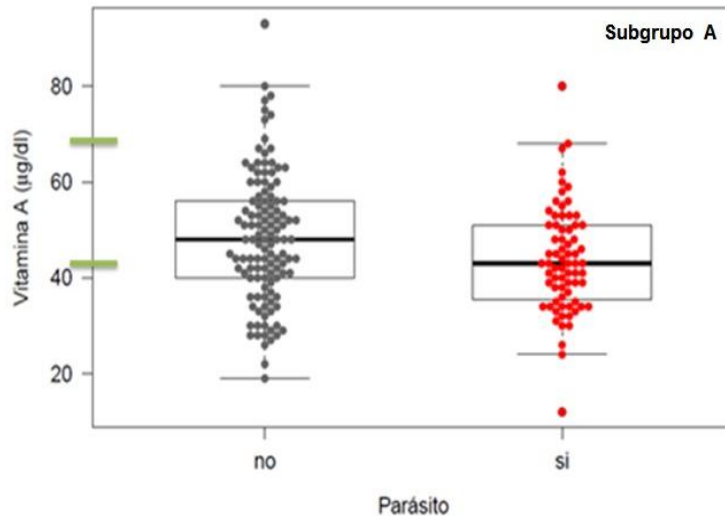


Figura 28: Valores de vitamina A individuales para pacientes del subgrupo A; parasitados (rojo) y no parasitados (negro). Rango de referencia líneas verdes en eje de ordenadas.

Como resultado de la regresión lineal de los valores de cada situación y comparación entre ellos se obtuvo un valor promedio de vitamina A de -5,8 puntos, para los pacientes con malabsorción y parasitados respecto a los no parasitados (valor promedio de 48,8), es decir valores promedio significativamente inferiores en presencia de parásitos ($p=0,0112$). Los datos de déficit de vitamina A más acusado se encuentran entre los parasitados.

Por último, dentro del subgrupo A y los pacientes parasitados, se llevó a cabo un análisis del posible efecto de la parasitación intestinal por una especie concreta, relacionado con el hábitat de parasitación o su poder patógeno, sobre los niveles de vitamina A.

Las especies parásitas que se analizaron fueron las más prevalentes en el estudio: *G. intestinalis* y *Blastocystis* sp. Como se puede observar en la Figura 29 sobre frecuencia de déficit de vitamina A asociada a la parasitación, fue en aquellos pacientes parasitados con *Giardia* donde se acumularon un mayor número de casos con déficit de vitamina A, el 51,6% de los afectados, seguido por el 50,6% de los parasitados por *Blastocystis*, en ambos casos por encima del 33% de déficit detectado en los pacientes del mismo subgrupo, sintomáticos y con malabsorción, pero sin parásitos.

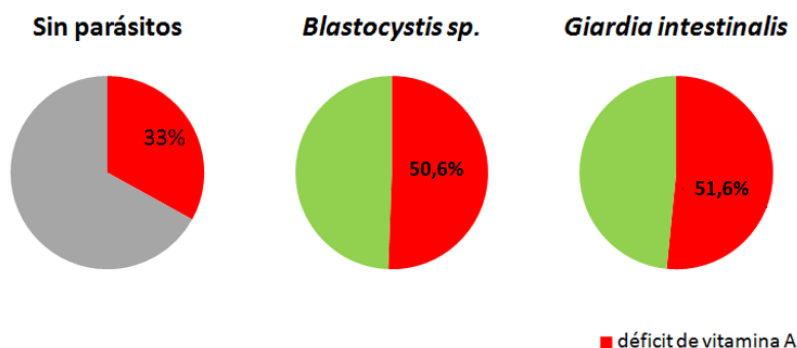


Figura 29: Frecuencia de sujetos del subgrupo A con déficit de vitamina A respecto a los rangos de referencia según si están parasitados o no y según la especie.

Al comparar mediante regresión lineal los valores analíticos individuales de los sujetos afectados por cada especie parásita en paralelo con los de los sujetos no parasitados se detectó un descenso medio de los valores de -6,6 puntos por debajo para los parasitados por *G. intestinalis*, resultando este dato estadísticamente significativo ($p=0,0035$). Sin embargo, en los casos de parasitosis por *Blastocystis* sp., aunque el valor promedio también fue negativo -4,4, indicando un valor inferior al de los no parasitados, esta diferencia no resultó lo suficientemente marcada para resultar significativa ($p=0,230$).

4.3.1.2 Vitamina D

En el análisis descriptivo se apreciaba una tendencia general al déficit de vitamina D, tanto en pacientes, como en controles. Como muestra la Figura 30, en la que se representan los valores individuales ($\mu\text{g/ml}$) como un punto dentro del grupo al que pertenece, las medianas en todos los casos son inferiores respecto a los rangos de referencia (líneas verdes en eje de las ordenadas), se observa una situación de déficit generalizada, en todos los casos la mediana es inferior al rango, y los casos de pacientes presentan los datos más bajos de esta vitamina. Para analizar estadísticamente si las diferencias que se apreciaban en la Figura 30, de nuevo y como en el caso de la vitamina A, se realizó una regresión lineal en la que se modelizó la estructura de la varianza y se compararon los valores en función del subgrupo y respecto a los controles.

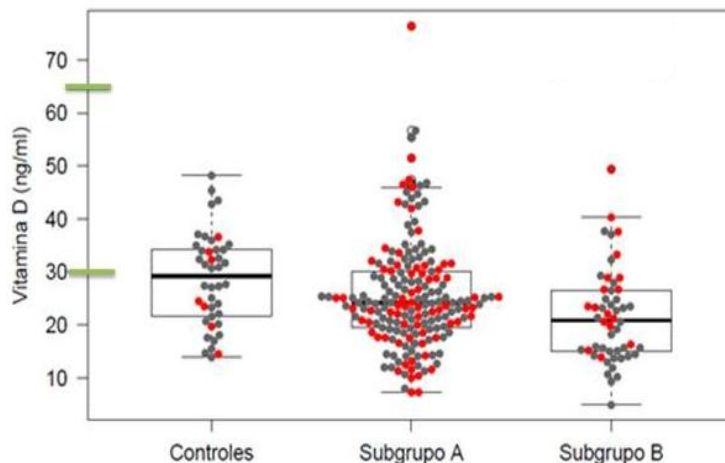


Figura 30: Valores de vitamina D individuales por grupo y subgrupo. Rango de referencia líneas verdes en eje de ordenadas.

Para el caso del subgrupo A, pacientes con malabsorción, el valor del efecto del subgrupo fue de $-3,04$ respecto a los $28,6$ puntos de los controles, lo cual significa un promedio de 3 puntos por debajo en los valores de este subgrupo, descenso significativo ($p=0,049$). El mismo efecto se detectó entre los pacientes del subgrupo B, con un valor de $-6,98$ respecto al control y una $p=0,0002$. Dentro del subgrupo A, y

para los parasitados, se continuó con el análisis para estudiar si la parasitación tenía efecto sobre los niveles de vitamina D y tras la regresión lineal y comparación de los valores obtenidos con parasitados y no parasitados se obtuvo un valor para los primeros de $-0,18$, es decir ligeramente inferior al de los pacientes sin parásitos, que obtuvieron un valor de $25,6$. No se pudo demostrar que la presencia del parásito tenga un efecto significativo sobre la absorción de la vitamina D ($p=0,092$), pero sí el hecho de pertenecer al grupo de pacientes y tener síntomas.

4.3.1.3 Vitamina E

Para finalizar el análisis, se llevó a cabo un matriz de correlación entre los valores analíticos obtenidos para vitaminas y minerales para evaluar la posible existencia de correlación entre sus comportamientos analíticos mediante el coeficiente de correlación de Pearson, índice utilizado para medir el grado de relación que tienen dos variables, ambas cuantitativas. De todos los datos comparados, únicamente se muestra correlación entre los valores de la vitamina A y la vitamina E, con un coeficiente de correlación de $r=0,32$, lo cual sería indicativo de que en los pacientes en los que se ha detectado deficiencias de vitamina A, también se detectan niveles de vitamina E inferiores, aunque en el análisis descriptivo general no haya quedado patente dicha deficiencia mediante medias y medianas.

4.3.2 MARCADORES DE INFECCIÓN/INFLAMACIÓN

El segundo grupo de variables estudiadas lo forman los marcadores de infección/inflamación: los anticuerpos séricos totales y las proteínas de fase aguda (Tabla 13); y el recuento leucocitario, porcentajes y valores absolutos (Tabla 14), cuyos niveles pueden verse alterados en procesos infecciosos o inflamatorios. Continuando con el análisis descriptivo exploratorio de la muestra, se compararon entre los pacientes y los controles los resultados de medias y medianas.

Tabla 13: Valores de media y mediana de anticuerpos y proteínas de fase aguda obtenidos para pacientes e individuos sanos.

| MARCADORES INFECCIÓN/ INFLAMACIÓN | CONTROLES | PACIENTES | RANGOS DE REFERENCIA |
|---|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| | Media (SD) Mediana (1°/3°Q) | Media (SD) Mediana (1°/3°Q) | |
| Anticuerpos totales: | | | |
| IgA | 214,1 (72,5) 209 (165,5/274,5) | 219 (87,8) 203 (160/269,8) | (70-310) mg/dl |
| IgM | 152,5 (118,7) 120 (95,5/151,5) | 124,4 (76,4) 108 (81/150,5) | (55-270) mg/dL |
| IgG | 1237,8 (224,2) 1240 (1120/1400) | 1079,1 (222,7) 1060 (930,2/1220) | (650-1.400) mg/dL |
| IgE | 93 (7,1) 93 (90,5/95,5) | 100,2 (227,8) 25,5 (8/79,5) | (0-100) U/dL |
| Proteínas de fase aguda: | | | |
| PROTEÍNA C REACTIVA | 2,2 (4,0) 1,2 (0,6/1,9) | 2,6 (3,6) 1,2 (0,5/3,2) | (0-8) mg/L |
| FERRITINA | 72,8 (83,4) 37 (24/90,5) | 75,9 (69,8) 56,5 (27/101,5) | (10-120) ng/dL |

Como se observa en la Tabla 13, se obtuvieron valores de anticuerpos totales muy parecidos en ambos casos y, todos ellos, dentro de los rangos de referencia. Se esperaban valores aumentados en el grupo de los pacientes por ser los que mayor prevalencia de parasitación mostraron, pero las medias resultaron ser muy parecidas.

En relación a las proteínas de fase aguda, que se esperaban aumentadas en relación a la inflamación en los pacientes, solo para la ferritina fue en la que se apreció un ligero aumento al comparar con el grupo control, encontrándose ambos valores dentro del rango de referencia.

Tabla 14: Valores de media y de mediana de células de la serie blanca para pacientes e individuos sanos.

| MARCADORES DE INFECCIÓN/ INFLAMACIÓN | CONTROLES | PACIENTES | RANGOS DE REFERENCIA |
|---|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| | Media (SD) Mediana (1°/3°O) | Media (SD) Mediana (1°/3°O) | |
| Recuento leucocitario: | | | |
| Porcentajes | | | |
| NEUTRÓFILOS% | 53,9 (8,6) 54,2 (48,9 /59,7) | 55,3 (9,7) 55,5 (48,4/61,5) | (35-80) |
| LINFOCITOS % | 34,2 (8,3) 34,2 (29,3/38,7) | 33,6 (8,6) 33,3 (27,4/39,4) | (20-45) |
| MONOCITOS % | 8,8 (2,3) 8,3 (7,4 /10) | 7,8 (1,9) 7,7 (6,4/9,1) | (4,0-12) |
| EOSINÓFILOS % | 2,4 (1,9) 2,2 (1,25/3) | 2,9 (1,9) 2,5 (1,5/3,8) | (1,0-5,0) |
| BASÓFILOS % | 0,4 (0,3) 0,4 (0,2/0,5) | 0,4 (0,3) 0,4 (0,2/0,6) | (0,0-1,5) |
| Valores absolutos | | | |
| NEUTRÓFILOS | 3,3 (0,9) 3,3 (2,7/ 3,7) | 3,6 (1,5) 3,4 (2,6/4,2) | (1,9-7,3) x10 ³ /μL |
| LINFOCITOS | 2,09 (0,6) 2,0 (1,6/2,4) | 2,1 (0,7) 2,0 (1,6/2,4) | (1,0-3,0) x10 ³ /μL |
| MONOCITOS | 0,5 (0,2) 0,5 (0,4/0,6) | 0,5 (0,2) 0,5 (0,4/0,6) | (0,3-1,0) x10 ³ /μL |
| EOSINÓFILOS | 0,2 (0,1) 0,1 (0,1/0,2) | 0,2 (0,2) 0,2 (0,1/0,2) | (0,0-0,5) x10 ³ /μL |
| BASÓFILOS | 0,02 (0,01) 0,02 (0,01/0,03) | 0,03 (0,02) 0,02 (0,01/0,03) | (0,0-0,2) x10 ³ /μL |

Cuando se compararon los valores relativos y los absolutos de cada subpoblación de leucocitos, no se observaron diferencias entre grupos. Además, todos los valores de medias y medianas obtenidos para ellos cumplen con los rangos de referencia.

Como no se obtuvieron diferencias en el análisis descriptivo entre grupos, no se continuó con el análisis por subgrupo.

4.3.3 OTROS MARCADORES ANALIZADOS

Otros parámetros que también se tuvieron en cuenta para la comparación entre pacientes y controles fueron los niveles séricos de albúmina, cuyo descenso ocurre en enfermedades hepáticas o en situaciones de desnutrición de larga duración, y los marcadores relacionados con anemia: hemoglobina, hematocrito y hematíes, relacionados con síndromes de malabsorción intestinal crónicos.

En el caso de la albúmina las diferencias entre medias y medianas al comparar el grupo control con los subgrupos de pacientes, y de los subgrupos entre ellos, son tan ligeras que no se continuó con el análisis estadístico (Tabla 15).

Tabla 15: Valores descriptivos de albúmina y marcadores de anemia para los subgrupos de estudio.

| OTROS MARCADORES ANALIZADOS | CONTROLES | SUBGRUPO A | SUBGRUPO B | RANGOS DE REFERENCIA |
|------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | Media (SD) Mediana | Media (SD) Mediana (1°/3°Q.) | Media (SD) Mediana | |
| ALBÚMINA | 4,5 (0,3) 4,5 (4,3/4,7) | 4,5 (0,3) 4,5 (4,3/4,6) | 4,4 (0,3) 4,5 (4,2 /4,6) | (3,4-5,4) g/dL |
| Marcadores de ANEMIA: | | | | |
| HEMOGLOBINA | 14,3 (1,1) 14,2 (14,0/14,3) | 13,2 (2,0) 13,3 (13,1/13,4) | 14,6 (2,1) 13,2 (14,3/14,7) | (12-18) g/dL |
| HEMATOCRITO | 41,7 41,7 (41,3/41,8) | 41,0 41,2 (41,3/4,5) | 45,5 45,4 (45,3/45,7) | (36,1-50,3) % |
| HEMATÍES | 4,8 4,5 (4,3/4,6) | 4,62 4,5 (4,2/4,6) | 4,8 4,5 (4,1/4,6) | (3,8-6,5) x10 ¹² /L |

En relación a los marcadores de anemia, con ninguno de los tres marcadores se observaron diferencias sustanciales entre las medias y medianas obtenidas a partir de los datos individuales. Se analizaron por regresión lineal los valores individuales en función del grupo, del subgrupo y de estar “parasitado” /“no parasitado” y en ningún caso se obtuvieron diferencias significativas.

4.4 FACTORES DE RIESGO DE PARASITOSIS INTESTINAL

Durante la anamnesis que se realizó a todos los participantes al ingreso al estudio se les cuestionó sobre determinados factores de riesgo, situaciones personales y hábitos, potencialmente relacionados con la adquisición de una parasitosis intestinal. Los parámetros analizados fueron recopilados de estudios epidemiológicos sobre parasitosis intestinales en países industrializados (Fletcher *et al.*, 2012; Horton *et al.*, 2018) y fueron los siguientes.

- 1) **Nacionalidad extranjera:** se tomaba como posible factor de riesgo para aquellos casos de personas que, aunque residían de forma permanente en España, provenían de países endémicos de parasitosis intestinales y que viajaban regularmente a su país de origen.
- 2) **Profesión de riesgo:** entendiéndose por ello, cualquier trabajo en el que se esté en contacto directo con humanos (niños, sobre todo, pero también adultos), animales y/o sus excrementos.
- 3) **Consumo habitual de frutas o verduras ecológicas:** se entiende por cultivo ecológico aquel que evita el uso de productos químicos de síntesis como fertilizantes, abonos, herbicidas y pesticidas, y que en ocasiones se abona con excrementos animales.
- 4) **Contacto con animales:** en el ambiente urbano el contacto con animales puede ser que se restrinja a las mascotas en la mayoría de los casos, pero también puede darse el contacto con otros animales por aficiones o por combinar la vida rural con la urbana.
- 5) **Viajes a países endémicos:** se preguntaba si habían viajado en los últimos cinco años a países tropicales o subtropicales por ser en su mayoría endémicos en parasitosis intestinales existiendo la posibilidad de parasitismo importado con clínica gastrointestinal relacionada en el tiempo con dicho viaje o a la vuelta del mismo (diarrea del viajero).

En un primer análisis, se calculó la frecuencia de la asociación entre las parasitosis diagnosticadas entre los participantes y cada uno de los factores de riesgo. Los potenciales factores asociados con la prevalencia parasitosis intestinales se examinaron mediante un análisis univariado (Tabla 16). La variable dependiente fue estar parasitado, mientras que las variables independientes fueron la nacionalidad, hábitos y condiciones de vida.

Tabla 16: Frecuencia de la asociación entre parasitosis y los potenciales factores de riesgo.

| VARIABLES | N | Parasitados | | OR (IC del 95%) | Valor <i>p</i> |
|------------------------------|-----|-------------|------|--------------------|----------------|
| | | n | % | | |
| Nacionalidad extranjera | 17 | 9 | 52,9 | 1,32 (0,41-4,29) | 0,640 |
| Profesión de riesgo | 56 | 26 | 46,4 | 2,16 (1,14-4,21) | 0,022* |
| Viajes a zonas endémicas | 75 | 37 | 49,3 | 1,9 (1,03-3,57) | 0,043* |
| Contacto con animales | 89 | 37 | 41,6 | 1,67 (0,95-2,92) | 0,072 |
| Frutas y verduras ecológicas | 180 | 95 | 52,8 | 6,81 (4,03-11,9) | <0,001* |

N: n° de individuos que presentan esta variable; n: n° de individuos parasitados; OR: Odds ratio; IC: intervalo de confianza. Las diferencias significativas respecto al control se representan con asteriscos (*).

Todas las variables que se consideraron respecto a la presencia de parásitos se incluyeron en un análisis estadístico para identificar los factores de riesgo de parasitosis. El nivel de significación estadística se estableció como $p < 0,05$, y para cada factor estadísticamente significativo, se calculó el *Odds Ratio* (OR) con un intervalo de confianza (IC) del 95% mediante el análisis de regresión logística univariable y multivariable (Tabla 16).

Se identificaron tres factores de riesgo que incluía: la profesión de riesgo por contacto directo con humanos, animales o sus excrementos (OR = 2,16; IC del 95% = 1,14-

4,21; $p = 0,022$), viajes a zonas endémicas en los últimos años ($OR = 1,90$; IC del 95% = 1,03–3,57; $p = 0,040$), y finalmente, los participantes que consumían de forma habitual frutas y verduras ecológicas tuvieron las mayores tasas de infección por lo que fue el factor con mayor riesgo de transmisión de parásitos ($OR = 6,81$; 95% IC = 4,03–11,9; $p < 0,001$). A pesar de que el contacto directo con animales (41,6%; $p = 0,07$) y tener una nacionalidad de un país endémico (52,9%; $p = 0,64$) fueron factores que tuvieron tasas de infección altas, estas variables no resultaron estadísticamente significativas (Tabla 16).

4.5 ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN PARÁSITOS-MALABSORCIÓN

Conocida la prevalencia de parásitos intestinales entre la población de estudio y su estado de malabsorción al ingreso, en este apartado se analiza la posible relación entre la infección y la incapacidad de absorción, para tratar de clarificar el papel de la parasitación, como desencadenante o agravante, de dichos síndromes de malabsorción.

4.5.1 ASOCIACIÓN PRESENCIA DE PARÁSITOS Y ESTADO DE MALABSORCIÓN

Partiendo de una prevalencia de parasitación del 41,8% entre los 213 pacientes del subgrupo A, con malabsorción simple o combinada, se realizó un análisis inicial de la asociación entre la presencia de parásitos (independientemente de la especie) y la malabsorción.

En la siguiente Figura 31 se representa el análisis de la probabilidad de padecer algún tipo de malabsorción en función de si está parasitado o no. La probabilidad de tener malabsorción es mayor en los pacientes parasitados (72%), que en los no parasitados (53%)

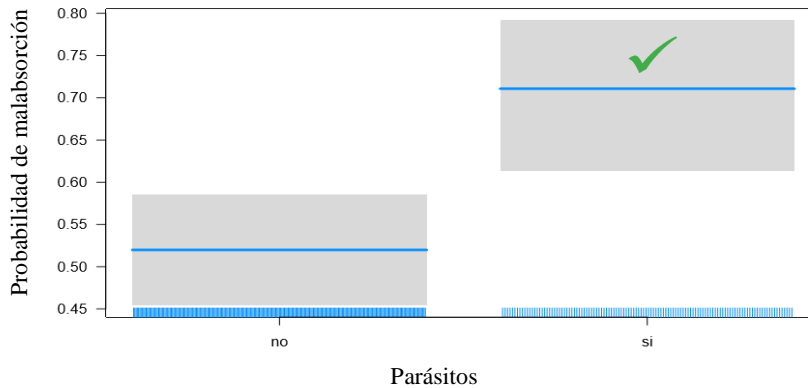


Figura 31: Análisis de la probabilidad de presentar malabsorción en asociación a las parasitosis intestinales.

Tras el análisis estadístico de los resultados mediante regresión logística ajustada por edad y comorbilidad, debido a que los resultados no eran homogéneos, se obtuvo una asociación significativa entre la presencia de parásitos y el estado de malabsorción de carbohidratos (OR = 2,27; IC del 95% = 1,39-3,78; $p < 0,001$).

4.5.2 ASOCIACIÓN PRESENCIA DE PARÁSITOS Y MALABSORCIÓN A FRUCTOSA

Del total de los pacientes con malabsorción a carbohidratos, la de fructosa fue la más frecuente (63,6%). En este contexto, se analizó la probabilidad de padecer malabsorción a fructosa en función de la presencia o no de parásitos intestinales (Figura 32).

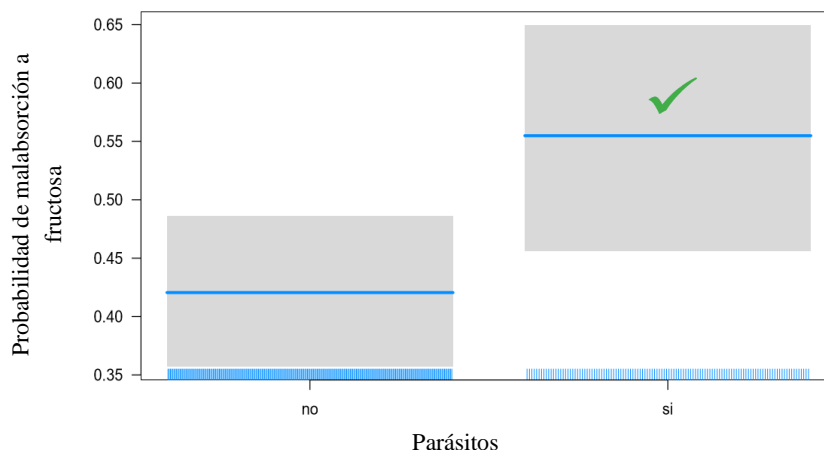


Figura 32: Análisis de la probabilidad de presentar malabsorción a fructosa en asociación a las parasitosis intestinales.

La Figura 32 muestra como la probabilidad de padecer intolerancia a fructosa entre los parasitados (57%) es superior a la de los “no parasitados” (43%). El análisis mediante regresión logística de la asociación entre ambas variables, nos mostró una relación estadísticamente significativa entre ambas (OR = 1,72; IC del 95% = 1,8-2,7; $p = 0,020$) a pesar que la parasitación intestinal, independientemente de la especie parásita, aumenta la probabilidad de desarrollar malabsorción a fructosa.

Un segundo análisis, y para concretar más el papel que juegan los parásitos, se repitieron los análisis anteriores teniendo en cuenta las especies implicadas y su hábitat de parasitación. Los parásitos que se analizaron respecto a la variable malabsorción a fructosa fueron los más prevalentes: *G. intestinalis* y *Blastocystis* sp., junto con los casos de *C. parvum* por su carácter patógeno. Asimismo, se hizo un primer análisis para los protozoos que afectan a la parte alta de intestino delgado, zona con elevada capacidad de absorción de nutrientes, *Giardia* y *Cryptosporidium*; y un segundo análisis para *Blastocystis* sp., que habita en el intestino grueso.

Al analizar la prevalencia de malabsorción a fructosa entre los parasitados por las especies de intestino delgado (*Giardia/Cryptosporidium*), se observó que de los 58 pacientes con malabsorción y parasitados, 52 de ellos (89,5%) presentaban malabsorción de tipo fructosa. Tras el análisis estadístico de los resultados mediante regresión logística se confirmó que la presencia de *Giardia/Cryptosporidium* se manifiesta como malabsorción a fructosa con una frecuencia significativa (OR = 3,08; IC del 95% = 1,7-5,7; $p < 0,001$) y, por tanto, se puede considerar a dichos parásitos como dañinos. Se calculó el riesgo relativo que supone la parasitosis respecto a la malabsorción a fructosa y resultó ser de 2, que significa que las personas infectadas por dichos parásitos tienen el doble de riesgo de padecer malabsorción a fructosa que las que no lo están.

Por último, se valoró la relación entre *Blastocystis* sp., parásito del cólon, y la malabsorción a fructosa. De los 45 pacientes diagnosticados de dicho parásito, el 51,1% padecían de malabsorción de fructosa, sin embargo, a pesar de ser elevado el porcentaje de asociación, no se confirmó una asociación significativa entre ambas variables tras el análisis estadístico (OR = 0,85; IC del 95% = 0,4-1,6; $p = 0,076$).

4.5.3 ASOCIACIÓN PRESENCIA DE PARÁSITOS Y MALABSORCIÓN A LACTOSA

La malabsorción de lactosa la padecían 127 de los representantes del subgrupo A (59,6%). Cuando se analizó cuál era la probabilidad de padecer dicha malabsorción entre los parasitados se obtuvo un 37%, lo cual se encontraba ligeramente por encima de lo obtenido en los casos negativos (32%) (Figura 33).

Además del análisis general se valoró el estar parasitado por parásitos de parte alta intestinal (*Giardia/Cryptosporidium*) y tener malabsorción a lactosa. Se detectaron 29 casos de malabsorción entre 58 pacientes parasitados (50%). El análisis estadístico de los resultados no mostró relación significativa para este tipo de malabsorción y las especies que parasitan duodeno/yeyuno (OR = 1,32; IC del 95% = 0,7-2,3; $p = 0,089$).

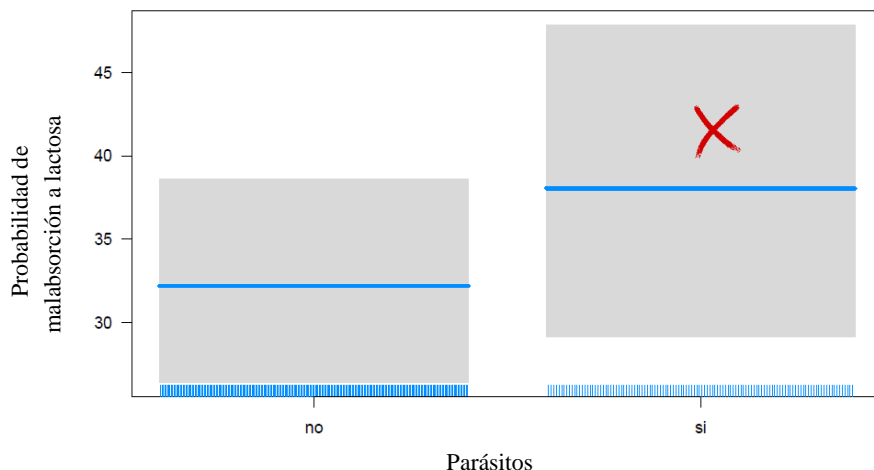


Figura 33: Análisis de la probabilidad de presentar malabsorción a lactosa en asociación a las parasitosis intestinales.

En un último análisis, se observó que de los 45 pacientes parasitados con *Blastocystis*, 19 de ellos presentaban malabsorción a lactosa, por tanto, una prevalencia del 42,2%. Tampoco en el este caso del parásito colónico, el análisis estadístico mostro significancia (OR = 1,24; IC del 95% = 0,6-2,4; p = 0,099).

4.6 VALORACIÓN DE LA EFICACIA DE LA TERAPIA COMBINADA

La terapia combinada (farmacológica y dietético-nutricional) se aplicó a los pacientes del subgrupo A (sintomáticos con malabsorción) con diagnóstico de parásitos intestinales. Asimismo, solo para este apartado del estudio se creó un control interno dentro del subgrupo A con pacientes “no parasitados” denominado “Control Interno”, a los que se les aplicó también la misma terapia dietético-nutricional que a los parasitados durante un año. Finalizados estos tratamientos se les repitieron las pruebas de malabsorción para valorar la evolución clínica y capacidad de absorción de carbohidratos.

4.6.1. VALORACIÓN DE LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

El tratamiento antiparasitario que se siguió fue el recomendado con el fármaco de elección para cada especie parásita según *The Medical Letter On Drugs and Therapeutics, Drug for Parasitic Infections* (Abramowicz *et al.*, 2007; Abramowicz, 2013). Los encargados de pautar la medicación fueron los médicos incluidos dentro del proyecto de investigación del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital La Fe.

A todos los pacientes con *G. intestinalis*, se les trató como primera opción con metronidazol, 250 mg cada 8 horas durante 7 días. En la práctica clínica, se demostró que estos tratamientos no eran efectivos en todos los casos y al reevaluar a los pacientes continuaban parasitados. En estos casos, se buscaron tratamientos alternativos o pautas de administración diferentes, en busca de una mayor eficacia. Por tanto, como segunda opción terapéutica se pautó tinidazol, 2 g a dosis única. Si con esto no se conseguía eliminar el parásito, la siguiente opción propuesta fue administrar de nuevo metronidazol a la misma dosis 500 mg cada 8 horas durante 7 días, repitiendo la pauta con una semana de descanso entre medio.

Solo para algunos casos en los que se agotaron las posibilidades anteriores de tratamiento, se empleó la nitaxozanida (tratamiento no comercializado en España, que se consiguió como medicamento extranjero a través de la farmacia del Hospital la Fe). Además, este fármaco se empleó para un paciente que combinó *G. intestinalis* y *C. parvum* (500 mg vía oral, dos veces al día, 3 días) por ser el de elección para este último y también efectivo frente a *G. intestinalis*.

En cuanto a *Blastocystis*, se empleó como elección metronidazol 750g cada 8 horas durante 10 días. En los casos de fallo terapéutico se repetía el mismo tratamiento.

Al final del estudio un 15% de los pacientes parasitados han necesitado más de un tratamiento farmacológico para eliminar sus parásitos. Hasta en 45 casos se necesitó repetir el tratamiento antiparasitario, en 9 casos se necesitaron 2 tratamientos, y 3

casos necesitaron hasta 4 tratamientos. Cabe destacar que la gran mayoría de los casos en los que la medicación no eliminó los parásitos, estaban diagnosticados de enfermedades autoinmunes o alguna inmunosupresión, y todos pertenecían al grupo de pacientes (subgrupos A y B).

Para otros parásitos de menor importancia clínica como, *E. nana* y *E. coli*, se valoró la clínica del paciente antes de pautar el tratamiento, y como en todos los casos era compatible con alteraciones gastrointestinales se decidió tratar con metronidazol (250 mg cada 8 horas durante 7 días) y paramomicina (25-35 mg/kg/día repartidas en 3 dosis entre 5-10 días), respectivamente. Para los casos de *E. hartmanni* y *I. butschlii* como iban acompañados de *E. nana* o de otra especie primaria como *G. intestinalis* y *Blastocystis* sp., se trató con el fármaco de elección para estos últimos.

4.6.2 VALORACIÓN DE LA EFICACIA DEL MANEJO DIETÉTICO-NUTRICIONAL

Después de aplicar durante unos meses las recomendaciones comentadas en el apartado de material y métodos, con la restricción o supresión parcial de los alimentos citados en el protocolo FODMAPs, surgieron algunas limitaciones.

Cuando se eliminaba de forma completa o casi completa la lactosa o fructosa de la dieta durante 2 meses, tal y como marcaba el protocolo FODMAPs (Huamán *et al.*, 2014), al intentar reintroducirla de forma general les generaba un aumento de gases, distensión e incluso diarrea, aunque la tomarán en cantidades pequeñas. Asimismo, se detectó que los pacientes presentaban poca adherencia a la dieta, ya que la describían como monótona y poco variada, y algunos de ellos por la supresión de los alimentos de origen vegetal que se les hacía, empezaron a tener efectos secundarios como el estreñimiento y todas las consecuencias que este genera (distensión abdominal, malestar...). Por ello, se valoró la problemática y se decidió cambiar el procedimiento de actuación, diseñando un nuevo protocolo de intervención dietético-nutricional para estos pacientes que se describe a continuación.

Se decidió incluir dentro del manejo de los pacientes la solicitud de un “diario dietético”. Ésta, es una herramienta de trabajo usada para valorar los hábitos alimenticios del paciente durante varios días, y así poder valorar sus hábitos de consumo. Para ello, se les hacía entrega a los pacientes un documento impreso para rellenar durante 4 días, tres entre semana y 1 de fin de semana, alterno o consecutivo, según preferencias. Asimismo, se les explicaba cómo debían anotar todos los alimentos consumidos y, en caso de haberlos, los síntomas post-ingesta, para evaluar con qué alimentos o en qué momentos aparecía más sintomatología e intentar paliarla con intervención dietética.

Junto con la información escrita, se les indicaba que debían recortar o hacer una foto a todas las etiquetas con los ingredientes y tabla de composición de los alimentos envasados que consumían con el objetivo de analizar la composición de cada uno de ellos y valorar si estaba indicado tomarlo según los síntomas que referían (Figura 34).

Con la información recogida de los hábitos dietéticos, sintomatología post o previa ingesta y los resultados de las pruebas de malabsorción, se ajustaba la alimentación del paciente con intervenciones dietéticas personalizadas con la pretensión de minimizar la sintomatología gastrointestinal autoreferida en el diario dietético y en la anamnesis realizada el primer día del estudio. El análisis del diario dietético fue personalizado. De esta forma se obtenía información cualitativa y cuantitativa de la ingesta diaria, y se trabajaba junto con él para enseñar y educar que alimentos concretos evitar, y por qué, según el contexto de síntomas y diagnóstico que presentaba.

Desayuno

Alimentos/cantidades a ser posible pesadas y hora

Leche de almendras con 4 galletas María.

Presencia de síntomas (Dolor, distensión abdominal/Flatulencias, diarrea, pesadez, dispepsia.)

Gases e hinchazón abdominal

Almuerzo

Alimentos y su peso y hora

Yogurt de fresa

Presencia de síntomas

Más gases y empiezan los pinchazos de dolor en la parte izquierda baja del abdomen.

Galletas María

GALLETAS MARIÁ. Ingredientes: Harina de TRIGO 74,3%, azúcar, grasa de palma, jarabe de glucosa y fructosa, suero de **LECHE** en polvo, gasificantes (bicarbonato de amonio, bicarbonato de sodio), sal, emulgentes (lecitina de **SOJA**, lecitina de girasol), agente de tratamiento de la harina (**METABISULFITO** de sodio), aroma.

Yogurt de fresa

ESPECIALIDAD LÁCTEA CON FRESA, CON AZÚCAR Y EDULCORANTES.

Ingredientes: **Leche** desnatada, fresa (9,5%), fructosa, almidón modificado, aroma, espesante: pectina, conservante de la fruta: sorbato potásico, edulcorantes: acesulfame potásico y sucralosa, colorante: carmines, fermentos **lácticos**.

Leche de almendras

INGREDIENTES: agua, azúcar, **almendra (2%)**, fosfato tricálcico, sal marina, estabilizadores (goma de garrofin, goma gellan), emulgente (lecitina de girasol), vitaminas (riboflavina (B2), B12, D, E).

Figura 34: Ejemplo de material dietético con etiquetas y diario recibido del paciente en el que se registran sus ingestas, síntomas post-ingesta y los ingredientes de los productos envasados consumidos.

De forma general, en los diarios dietéticos valorados, llamaba la atención el consumo diario y reiterado de productos ultraprocesados tipo galletas, barritas de cereales, zumos envasados, cereales de desayuno, yogures azucarados y snacks dulces y salados, que había desplazado casi por completo al consumo de fruta. Este tipo de productos contienen en ocasiones cantidades de fructosa más altas que la propia fruta o verdura, en forma de jarabes de fructosa o fructosa libre añadidos en el proceso de fabricación de estos productos. Por ello cobra especial relevancia la exclusión de todos ellos de la dieta, para así, poder incluir según la tolerancia individual más cantidad de fruta y verdura, que beneficiará a largo plazo en mayor medida a la salud del paciente y así empezar el proceso de tolerancia y recuperación de la absorción.

Como se ha explicado anteriormente la malabsorción a fructosa secundaria, es una capacidad limitada de absorción, por tanto, lo que se ha cuantificado mediante la

prueba de hidrogeno espirado, es que los pacientes no absorben 25 g de fructosa, así que, sabiendo esta cifra como ingesta máxima, se puede jugar con la cantidad de fruta y verdura ingerida al día hasta conseguir encontrar la cantidad máxima de fructosa que tolera el paciente sin generarle sintomatología. El problema radica cuando otros alimentos muy azucarados están presentes de forma diaria y habitual en la dieta, y saturan la capacidad de absorción de fructosa por parte de los transportadores específicos.

Las pautas para mejorar la sintomatológica y salud en general de estos pacientes han sido el intentar evitar este tipo productos no beneficiosos, e introducir en pequeñas cantidades las frutas y verduras, con más glucosa que fructosa, según tolerancia individual, ya que probablemente al retirar este tipo de productos ultra procesados se mejore la tolerancia a dichos vegetales. Fue muy importante también ofrecer alternativas apetecibles y gustosas a estos pacientes para que ellos supiesen con que desplazar los productos no recomendados por otros con más calidad nutricional.

En general, la mayor parte de pacientes tuvieron una buena adherencia a estas recomendaciones, porque al eliminar este tipo de productos, mejoraron la sintomatología gastrointestinal referida de forma prácticamente inmediata y toleraban más cantidad de fruta y verdura en la reintroducción. Todo este proceso, se realizaba con el objetivo y la perspectiva de una vez eliminada la parasitosis el paciente recobrará la máxima tolerancia posible con el proceso paulatino de reintroducción de fruta, verdura y lactosa en los casos de malabsorción a dicho monosacárido. Cabe destacar que, en estos sujetos diagnosticados de alguna parasitosis intestinal, tienen un proceso de recuperación de la tolerancia y reintroducción mucho más lento, probablemente por el daño de la mucosa y desequilibrio inmunológico generado por el parásito, y esto en ocasiones conllevaba a que presentarían sintomatología que no tenía aparentemente relación con sus ingestas dietéticas, probablemente por las parasitosis subyacentes que coexistían.

Así pues, la idea principal era que una vez erradicada la parásitosis y con la reintroducción progresiva en la dieta de fructosa o lactosa dietética y limitada en los productos de mala calidad ya comentados anteriormente, el paciente debería volver a generar tolerancia pasado un tiempo si el daño de mucosa estaba originado por el parásito diagnosticado. En el caso de los pacientes que no tenían parásitos el objetivo era el mismo, recuperar la máxima tolerancia posible siguiendo las mismas pautas dietéticas que los parasitados, aunque en dichos sujetos no fuera la parásitosis la causa primera de su malabsorción.

4.6.3 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA REVALUADA TRAS LA TERAPIA

Se revaluaron un total de 38 pacientes, 31 de los cuales pertenecían al subgrupo A y habían estado parasitados, y 7 pacientes “no parasitados” conformaron el control interno creado para el estudio de la reevaluación (Tabla 17). Los inicialmente parasitados fueron 25 mujeres (80,6%) y 6 hombres (19,3%) con una media de edad de 37,6 años. En cuanto al control interno lo formaron 6 mujeres (85,7%) y 1 hombre (14,3%), con una media de edad de 35,3 años. De los 31 pacientes parasitados valorados había 26 con malabsorción a fructosa y 17 con malabsorción a lactosa. En cuanto al control interno, presentaban 6 malabsorciones a fructosa y 3 de lactosa.

Tal y como muestra la Tabla 17, entre los pacientes revaluados predominaban, como en el estudio en general, los casos de *Giardia* (48,4%), seguidos de los de *Blastocystis* (35,5%), y además se revaluó un paciente afectado por *C. parvum* (3,2%).

Tabla 17: Características de los pacientes revaluados tras la intervención terapéutica.

| REVALUADOS | | Parasitados inicialmente (n=31) | No parasitados (n=7) |
|-------------------------|--|------------------------------------|-------------------------|
| Sexo | | | |
| | Femenino, n (%) | 25 (80,6%) | 6 (85,7%) |
| | Masculino, n (%) | 6 (19,3%) | 1 (14,3%) |
| Edad | | | |
| | Años (media) | 37,9 | 35,3 |
| | mínimo-máximo | (21-70) | (25-57) |
| Malabsorción | | | |
| | Fructosa, n (%) | 26 (83,7%) | 6 (85,7%) |
| | Lactosa, n (%) | 17 (54,8) | 3 (42,9%) |
| Especie parásita | | | |
| | <i>G. intestinalis</i> , n (%) | 15 (48,4%) | - |
| | <i>Blastocystis</i> sp. n (%) | 11 (35,5%) | - |
| | <i>C. parvum</i> , n (%) | 1 (3,2%) | - |
| Comorbilidades | | | |
| | Síndrome de Intestino Irritable, n (%) | 7 (22,6%) | 1 (14,3%) |
| | Enfermedad Celíaca, n (%) | 3 (9,7%) | - |

Como se va a valorar la evolución de estos pacientes, es importante considerar si presentan comorbilidades como el Síndrome de Intestino Irritable o la Enfermedad Celíaca que puede impedir o dificultar la recuperación de la absorción intestinal. Se encontró dentro del grupo de estudio que 7 padecían SII (22,6%) y 3 enfermedad celíaca (9,7%).

4.6.4 COMPARACIÓN DE LOS TEST DEL ALIENTO INICIALES Y FINALES

Para evaluar el grado de malabsorción de los pacientes se empleó el test del aire espirado, tanto en los test iniciales como en sus revaluaciones en busca de una posible mejoría en los resultados de la prueba.

Para clasificar a los participantes en función de su grado de malabsorción/intolerancia se estableció una escala según los niveles de gases obtenidos en los test del aire espirado (Hamilton, 1998). De menor a mayor grado de afectación de la absorción se clasifican de la siguiente manera:

- **Intolerancia:** H_2 o $H_2+CH_4 < 15- 20$ ppm; test negativo, pero el paciente refiere síntomas gastrointestinales durante la prueba.
- **Leve:** H_2 o H_2+CH_4 entre 20-40 ppm.
- **Moderada:** H_2 o H_2+CH_4 entre 40-60 ppm.
- **Grave:** H_2 o H_2+CH_4 mayor a 60 ppm.

Al final de la intervención se calculó el porcentaje total de pacientes que habían obtenido pruebas de malabsorción a fructosa o lactosa negativas, por tanto, habían recuperado la capacidad total de absorción. La terapia consiguió la recuperación total de la absorción en 20 pacientes (45,5%). En cuanto al grupo de no parasitados revaluados, mejoraron totalmente 2 (20,0%) (Tabla 18). En cuanto a los sujetos con malabsorción a fructosa, se calculó también el porcentaje de mejoría total de los pacientes parasitados, que fue un 29,5%, y en cuanto a lactosa hubo un porcentaje de negativización del 15,9%. En los sujetos no parasitados o control interno hubo dos casos de negativización (20,0%), uno con malabsorción inicial a fructosa (10,0%), y otro a lactosa (10,0%) (Tabla 18).

Tabla 18: Porcentajes y número de casos de mejoría total en pacientes revaluados de malabsorción lactosa o fructosa, parasitados y no parasitados.

| | Parasitados | | No parasitados | |
|-------------------------|-------------|-------------|----------------|-------------|
| | Nº casos | % | Nº casos | % |
| Casos revaluados | 44 | - | 10 | - |
| Negativización fructosa | 13 | 29,5 | 1 | 10,0 |
| Negativización lactosa | 7 | 15,9 | 1 | 10,0 |
| Total | 20 | 45,5 | 2 | 20,0 |

Para finalizar con el análisis de la evolución de los pacientes revaluados, se debe mencionar que no todos los pacientes obtuvieron una recuperación total de la capacidad de absorción de carbohidratos, pero sí se observaron mejorías en cuanto a los resultados de la pruebas iniciales y finales cambiando su clasificación hacia niveles menos graves, por ejemplo, de moderado a leve o de leve a intolerancia, que fue lo más común (Tabla 19). De los pacientes parasitados revaluados, mejoraron parcialmente 10 de ellos (22,7%) tras la aplicación de la terapia combinada. En cuanto al grupo de “no parasitados” mejoraron sus pruebas 3 pacientes (30,0%).

Tabla 19: Distribución de casos según los niveles de malabsorción en la prueba inicial y final para parasitados y no parasitados

| | Parasitados | | | | No parasitados | | | |
|--------------|----------------|------|--------------|------|----------------|------|--------------|------|
| | Prueba inicial | | Prueba final | | Prueba inicial | | Prueba final | |
| | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| Intolerancia | 0 | 0 | 12 | 27,3 | 0 | - | 3 | 30,0 |
| Leve | 26 | 59,0 | 16 | 36,4 | 5 | 50,0 | 1 | 10,0 |
| Moderada | 17 | 38,6 | 15 | 34,1 | 4 | 40,0 | 3 | 30,0 |
| Grave | 1 | 2,27 | 1 | 2,27 | 1 | 10,0 | 1 | 10,0 |

De los 44 pacientes parasitados revaluados en la fase o prueba inicial hubo 26 malabsorciones leves (59,0%), 17 moderadas (38,6%) y 1 grave (2,27%) y tras la aplicación de la terapia combinada en la fase post se obtuvieron 12 intolerancias (27,3%), 16 malabsorciones leves (36,4%), 15 moderadas (34,1%) y 1 grave (2,2%). En cuanto a los 10 pacientes no parasitados revaluados, en la fase previa había 5 malabsorciones leves (50,0%), 4 moderadas (40,0%) y 1 grave (10,0%). Tras la intervención dietética se repitieron los test y se obtuvieron: 3 intolerancias (30,0%), 3 malabsorciones leves (30,0%), 3 malabsorciones moderadas (30,0%) y 1 grave (10%).

En la siguiente Figura 35, se muestra una representación gráfica de los niveles de hidrógeno durante las pruebas para el total de individuos revaluados, tanto parasitados como no, en los tiempos pre y post tras la intervención. Para este análisis comparado entre la representación lineal las pruebas pre y post, se realizó un plot zoom, donde se observó que la pendiente de la recta post es inferior, lo que se relaciona con unos niveles de hidrogeno espirado menores. El descenso de los niveles de hidrogeno para el total de casos revaluados resultó significativo, indicativo de una tendencia general de mejora y eficacia de la intervención ($p = 0,005$).

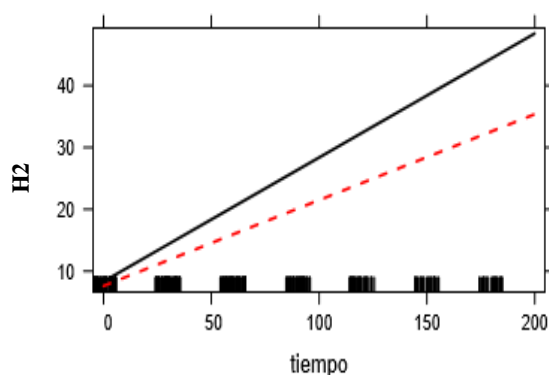


Figura 35: Representación gráfica de los tiempos pre (---) y post (- - -) de los valores de hidrogeno generales en los individuos revaluados.

Asimismo, se compararon las pruebas de hidrógeno entre los tiempos pre y post de los pacientes parasitados y no parasitados. En la figura 36 se puede apreciar que los parasitados tienen inicialmente valores más altos de hidrogeno (línea roja discontinua), pero tras la aplicación de la terapia combinada sus valores cayeron significativamente por debajo de los no parasitados (línea negra) ($p= 0,025$). Para los pacientes no parasitados, control interno, los niveles de hidrogeno son muy similares tanto en el tiempo pre como en el post-terapia (Figura 36).

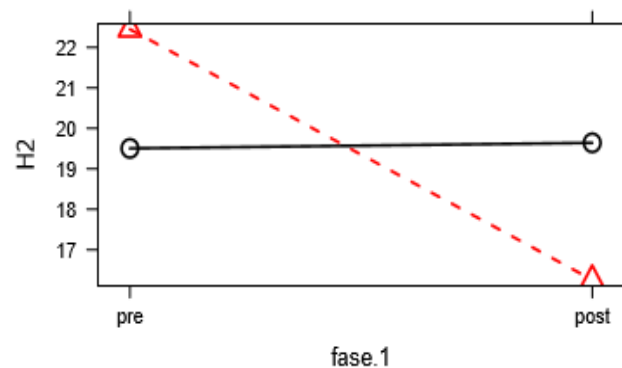


Figura 36: Representación gráfica de los tiempos pre y post de los pacientes parasitados (---) y no parasitados (- - -) revaluados.

Para el caso concreto de los pacientes diagnosticados de **malabsorción a fructosa** y parasitados, en la Figura 37, se muestra el total de los valores de hidrogeno antes de la terapia combinada y en la reevaluación.

Para el análisis estadístico de los resultados pre y post se realizó una regresión lineal y se compararon las pendientes de las rectas correspondientes a ambas pruebas y se observó un descenso significativo en los valores de hidrógeno ($p= 0,038$).

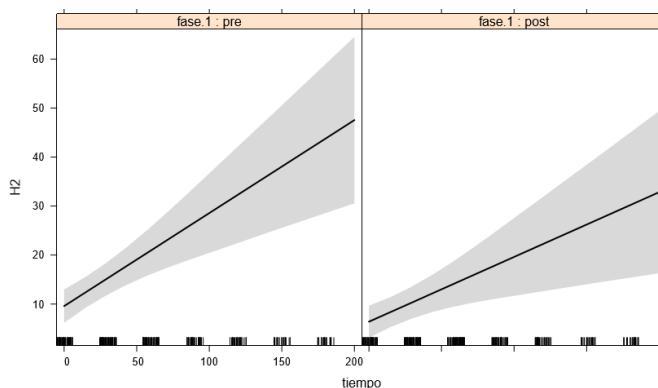


Figura 37: Representación gráfica de la comparación de las pendientes del total de las pruebas en tiempos pre y post tras aplicar la terapia combinada.

Habiendo confirmado que la aplicación de la terapia combinada había tenido un efecto beneficioso en los pacientes parasitados con malabsorción a fructosa, se estudió con detalle este efecto según la especie parasitaria, *Giardia* o *Blastocystis*, por su hábitat de parasitación diferenciado. Tras realizar la regresión lineal de las pruebas pre y post se obtuvo una mejoría significativa para los afectados por *Giardia* ($p= 0,046$), pero sin efecto significativo para *Blastocystis*.

Los mismos análisis se realizaron sobre pacientes con diagnóstico inicial de **malabsorción de lactosa** y parasitados (Figura 38), observándose una mejoría significativa en la absorción entre los tiempos pre y post aplicación de la terapia combinada ($p<0,001$).

Continuando con el análisis, se valoró el efecto de la especie parásita sobre la recuperación de los pacientes afectados, observándose una recuperación significativa de la absorción tras la eliminación de ambos parásitos, con una $p<0,001$ para *Giardia*, y una $p= 0,011$ para *Blastocystis*.

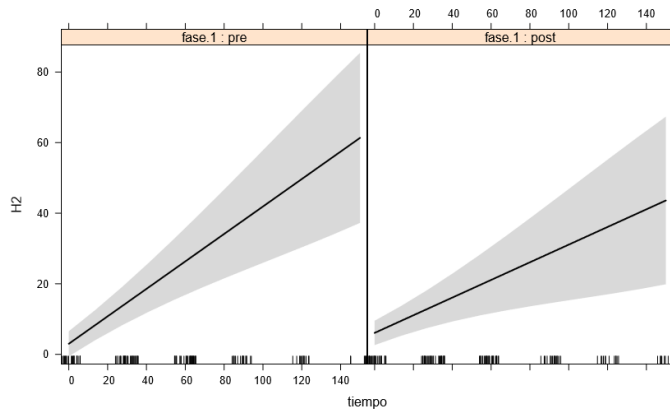


Figura 38: Representación de la pendiente de los valores de hidrogeno en los tiempos pre y post de los pacientes con malabsorción a lactosa.

Por último, se hizo el mismo análisis en el grupo de no parasitados. En ellos, tras comparar las pendientes de las rectas totales pre y post, no se apreció mejoría significativamente tras la aplicación de la terapia dietético-nutricional.

CAPÍTULO QUINTO

DISCUSIÓN

5.1 PREVALENCIA DE PARASITACIÓN Y ESPECTRO PARASITARIO

Habiendo analizado a 351 individuos y combinando técnicas diagnósticas, convencionales y moleculares, directas e indirectas, se obtuvo una prevalencia de parasitación entre los pacientes con trastornos gastrointestinales del 39,8%. Este dato es muy superior al que determinaron estudios similares en los que se analizaba la presencia de parásitos intestinales en pacientes con sintomatología gastrointestinal.

En concreto, en el estudio de Grazioli *et al.*, realizado en Italia en 2006, donde analizaba la prevalencia de *G. intestinalis* en pacientes sintomáticos, con síndrome de intestino irritable y dispepsia, mediante la combinación de técnicas parasitológicas, la microscopía óptica convencional y un ELISA de captura para antígenos comercial, ambas técnicas directas. Dichos autores analizaron dos tipos de muestras por paciente, heces y aspirado duodenal, obteniendo una prevalencia general de *G. intestinalis* de un 6,5%, alejado de nuestros resultados, que fueron de un 26,3%. En el mismo sentido, el diagnóstico de *G. intestinalis* en heces y aspirado duodenal, en pacientes con dispepsia que realizaron Fouad y colaboradores en 2014 en El Cairo (Egipto), mostró frecuencias de parasitación inferiores a las nuestras con los métodos diagnósticos empleados; en microscopía óptica obtuvieron un 10% de positividad, y con la amplificación del ADN del parásito mediante PCR convencional aumentaron los casos positivos hasta el 15,8%. De nuevo, los métodos diagnósticos empleados perseguían la detección de formas del parásito y no valoraron la respuesta frente a la infección desarrollada en el hospedador por ejemplo mediante la determinación de los niveles de anticuerpos específicos en suero u otros fluidos. Asimismo, en cuanto a nuestros resultados es importante destacar que solo se detectó a este parásito en uno de los individuos control (1,2%), por lo que podemos afirmar que en el caso concreto de nuestra población la presencia de *Giardia* suele ir relacionada con sintomatología gastrointestinal, incluso extraintestinal a pesar de que al describir el espectro clínico de dicho protozoo siempre se considera la posibilidad de casos asintomáticos.

En el caso de *Blastocystis* sp., su frecuencia en el grupo de pacientes también es elevada (13,6%), siendo el segundo parásito más prevalente, pero en este caso la situación es diferente a la descrita para *Giardia*, porque aunque hay estudios previos que detectaron mayores prevalencias de dicho parásito en pacientes con síndrome de intestino irritable que en los controles (Yakoob *et al.*, 2004), en nuestro caso la prevalencia entre los individuos control (13,4%) es muy próxima a la de los pacientes con síntomas, con lo que la relación de *Blastocystis* sp., con la clínica gastrointestinal y las malabsorciones no queda clara, como ya ocurrió en estudios previos como el de Tungtrongchitr *et al.* (2004) en pacientes con trastornos gastrointestinales crónicos. En un estudio reciente prospectivo sobre 3.070 inmigrantes en El Ejido (Almería) que acudieron a una Unidad de Medicina Tropical por trastornos gastrointestinales, se diagnosticaron 570 casos de blastocistosis (18,5%). Estas cifras son próximas a las de nuestro estudio, e incluso las superan, a pesar de que el método diagnóstico fue la microscopía óptica y la población estudiada también era adulta. Podría explicarse esta alta prevalencia debido a que la mayoría de los pacientes analizados procedían de África subsahariana y el Magreb, donde las medidas higiénico-sanitarias no son comparables a las de nuestro país (Losada-Ocaña *et al.*, 2018). Otro estudio realizado en la Comunidad de Madrid, en régimen ambulatorio, entre los años 2000-2001, mostró una prevalencia de parasitosis intestinal en individuos aparentemente sanos del 13,5%, porcentaje muy próximo al obtenido en el presente estudio, 14,6%. La especie parásita más prevalente fue *Blastocystis* sp., diagnosticada en el 39,3% de los individuos parasitados, seguida de *G. intestinalis*, con un 19,3% (Tajada *et al.*, 2002).

El hecho de que *Blastocystis* sp. sea tan prevalente en población control pondría en duda su potencial poder patógeno, pero yendo un poco más allá, es posible que siendo la misma especie parásita, haya diferencias genéticas a nivel de subtipo, que le otorguen una mayor o menor patogenicidad (Cifre *et al.*, 2018) o bien, como se postula en otros estudios, su poder patógeno no se relacione tanto con su genética sino con el microambiente intestinal del hospedador, determinado por su estado

inmunológico y su microbiota, o incluso posibles co-infecciones con otros patógenos (Scanlan *et al.*, 2013).

En cuanto a *C. parvum*, la prevalencia de parasitación detectada (0,9%) fue muy baja, aunque se aplicaron técnicas específicas para optimizar su diagnóstico (Ziehl-Neelsen modificado). Este hecho podría estar relacionado con las características de edad e inmunocompetencia de la población analizada, ya que es un parásito que suele afectar y cronificar en niños o personas con alguna inmunodeficiencia, y en el caso de adultos inmunocompetentes la infección podría autolimitar en unos días. Por otro lado, los casos anuales de criptosporidiosis declarados en de España según datos el Centro Nacional de Epidemiología (2017) fueron 557, frente a los 2.969 de giardiosis, por lo que epidemiológicamente está mucho menos extendido. Cabe destacar en cuanto a nuestros resultados, que los 2 casos de *C. parvum* incluidos en el estudio resultaron ser sujetos con déficit selectivo de IgA tras consultar sus resultados analíticos, lo cual predispone a dichas personas a la adquisición y cronicidad de las infecciones de mucosas. Además, para uno de los casos, la infección resultó ser doble junto con *G. intestinalis*.

Otro dato a tener en cuenta, fue que la muestra estudiada no estaba balanceada en cuestión de sexos, por lo que al realizar el análisis estadístico no se obtuvieron datos concluyentes. Esto podría ser debido a que en general, las mujeres acuden más a centros médicos que los hombres, ya que estos suelen prestar menor atención a los síntomas relacionados con alteraciones gastrointestinales. Este hecho ya es conocido y se describió con anterioridad (Rosa-Jiménez *et al.*, 2005) así como que los hombres que finalmente acudieron al hospital, por la tardanza en acudir al médico o por intenta normalizar la sintomatología existente, presentaban efectos secundarios más acusados, tales como mayor pérdida de peso y, en general, síndromes de malabsorción más acusados según sus analíticas sanguíneas.

5.2 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA *G. intestinalis*

Teniendo en cuenta la baja sensibilidad que para *G. intestinalis* alcanzan las técnicas convencionales (microscopía óptica y otras de diagnóstico rápido como la inmunocromatografía), la baja carga parasitaria y la eliminación intermitente de formas quísticas en heces con la que suelen cursar los casos crónicos de giardiosis, se emplearon en este estudio otras técnicas más sensibles como la detección en muestras de saliva de IgA anti-*Giardia* mediante ELISA y la PCR cuantitativa para la detección de ADN del parásito en heces.

Las prevalencias de *Giardia* obtenidas en nuestro estudio mediante técnicas directas fueron del 2,8% con la inmunocromatografía (ICT) para antígenos del parásito en heces, y del 4,8% con la observación microscópica de las heces concentradas previamente. Para completar el análisis se combinaron los métodos directos anteriores, con la detección de anticuerpos específicos IgA secretora anti-*Giardia* en saliva, mediante la técnica ELISA indirecto. Con este método se obtuvo una prevalencia del 17,7%, todos los casos diagnosticados por microscopía e ICT, también presentaron niveles positivos de anticuerpos en saliva, y además se sumaron nuevos casos que habían escapado a las pruebas coprológicas. Muy próximos a nuestros resultados fueron los obtenidos respecto a la prevalencia de *G. intestinalis*, en individuos sintomáticos, mediante técnicas coprológicas por Grazioli *et al.* (2006), que obtuvo una prevalencia del 6,5% al combinar varias técnicas directas sobre heces y aspirado duodenal. Superiores fueron los resultados de Fouad *et al.* (2014) tras analizar heces y aspirado duodenal de pacientes sintomáticos, los cuales mediante microscopía óptica diagnosticaron un 10% de casos positivos, seguidos muy cerca por otro estudio realizado por Abulhasan *et al.* (2013) entre pacientes con dispepsia que obtuvo un 11% de prevalencia con microscopía óptica de las heces y un 19% con ELISA de captura para antígenos parasitarios en heces, también técnica directa. Quizá esta mayor prevalencia de los dos estudios anteriores no estuvo condicionada por el tipo de muestra o la técnica diagnóstica, sino porque ambos estudios se realizaron en un país endémico de giardiosis como es Egipto, donde se ha llegado a declarar una

prevalencia del 44% en pacientes con dispepsia mediante el estudio de biopsias duodenales y coproparasitología con microscopía óptica (Yakoob *et al.*, 2005).

Como ya se apuntaba en estudios previos, y se ha podido confirmar con el presente, una alternativa al análisis coprológico tradicional es la detección de IgA secretora (IgAs) en saliva. Esta técnica ya había sido empleada con anterioridad en varios estudios sobre prevalencia de giardiosis que se tomaron como referencia para diseñar nuestra prueba. En ellos se demostró una clara relación entre los altos niveles de esta inmunoglobulina en saliva y la presencia de una infección activa. Por otro lado, demostraban algo de gran importancia en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de los casos de giardiosis, que fue el hecho que la resolución de la parasitosis provocaba un descenso rápido de los niveles salivales de dicha inmunoglobulina, a diferencia de los que ocurre con la IgG sérica, por lo que se postulaba esta estrategia diagnóstica como una herramienta útil para el seguimiento de la parasitosis y evaluación de la eficacia del tratamiento (El-Gebaly *et al.*, 2012). Por otro lado, la detección de IgA monomérica en suero resultó ser significativamente menos sensible que la detección de IgAs en saliva para la detección de casos positivos (Rodríguez *et al.*, 2004; Cedillo-Rivera *et al.*, 2009; El-Gebaly *et al.*, 2012). Queda demostrado que, aunque se trate de un protozoo no invasivo, sus componentes antigénicos son capaces de estimular los órganos linfoides y provocar una respuesta humoral específica de mucosas que puede ser empleada para el diagnóstico indirecto como alternativa cuando los análisis coprológicos convencionales puedan ser negativos, pero la sintomatología persiste. Aunque hay poca literatura al respecto, este método sería de gran utilidad en casos de giardiosis extraintestinales (canal biliar, pancreático...) (Wolfe, 1992), bajo la hipótesis de que ante una respuesta inmunitaria, el número de protozoos intestinales disminuye, y aquellos trofozoítos que escapan al ataque del sistema inmunológico se alojarán en el conducto pancreático o biliar mientras cambian su dotación antigénica (VSP) como mecanismo de evasión inmunológica descrito en múltiples ocasiones. Tras ello podrían colonizar periódicamente la mucosa del duodeno al que acudirán para alimentarse y replicarse. En estos periodos de ausencia intestinal, no se

eliminarían quistes en heces y el coprodiagnóstico daría lugar a falsos negativos, incluso empleando el más sensible de los métodos diagnósticos directos.

Estos mismos estudios (Cedillo-Rivera *et al.*, 2009; El-Gebaly *et al.*, 2012) demostraron que la técnica ELISA indirecto para la detección de IgAs en saliva tenían una sensibilidad del 76% y una especificidad del 95%. Por lo tanto, se puede considerar una técnica de gran utilidad para infecciones con baja carga parasitaria o localizaciones extraintestinales.

A modo de subestudio, incluido en la optimización del diagnóstico de *Giardia* en este tipo de pacientes, y para confirmar los casos positivos por anticuerpos elevados en saliva, se llevó a cabo un análisis de concordancia entre la técnica coprológica más sensible, la PCR cuantitativa o a tiempo real y el ELISA indirecto para saliva. Los resultados de la PCR fecal confirmaron 14 de los 19 pacientes positivos en saliva, y 10 de los 13 negativos. La tasa bruta de concordancia, probabilidad de que coincidan los resultados de ambas pruebas, fue del 75%. En el estudio ya citado de Fouad y colaboradores de 2014 mejoraron la sensibilidad del diagnóstico al incorporar la PCR convencional para *Giardia*, ascendiendo la prevalencia hasta el 15,8% tras combinarla con la microscopía.

Así pues, no existe a día de hoy un método de referencia o “*gold standard*” para el diagnóstico de giardiosis y menos en el tipo de pacientes analizados en este estudio, con infecciones probablemente crónicas, adultos e inmunocompetentes, por ello resulta conveniente combinar más de un método diagnóstico que valore por un lado la presencia del parásito y, por otro, la respuesta del hospedador frente a la infección para la detección de un mayor número de casos y su seguimiento tras el tratamiento antiparasitario.

5.3 ALTERACIONES ANALÍTICAS EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

En el presente estudio se incluyó un análisis sanguíneo a todos los pacientes para valorar sus niveles de vitaminas liposolubles e hidrosolubles, minerales y albúmina como indicadores, en casos deficitarios, de síndromes de malabsorción intestinal, así como otros marcadores de anemia y de infección o inflamación inespecífica como la IgA, IgM, IgG, IgE, PCR, la Ferritina y el recuento leucocitario.

Uno de los principales resultados obtenidos al valorar los resultados analíticos fue la detección de valores medios de vitamina A menores en el grupo de pacientes respecto al control, aunque en ambos casos dentro del rango de referencia para esta variable. Esto podría estar relacionado con que todos los individuos que forman el grupo de pacientes sufren de síntomas gastrointestinales, destacando entre ellos las deposiciones blandas o poco formos asociadas a diarrea y síndromes de malabsorción de nutrientes, por lo que era de esperar que la absorción de ciertas vitaminas fuese inferior con respecto a los individuos sin trastornos gastrointestinales (Rivera *et al.*, 2002; Alparo, 2005).

Si analizáramos estos datos deficitarios en vitamina A por subgrupos dentro de los pacientes, con malabsorción (subgrupo A) y sin malabsorción (subgrupo B), se observaba un mayor porcentaje de sujetos con déficit (40%) en aquellos pacientes con clínica y malabsorción de carbohidratos. De igual manera, esta alteración, resultó ser mucho menos frecuente en el grupo de individuos sanos (12%). Es posible que, en el subgrupo de pacientes con malabsorción, la integridad de mucosa esté más afectada o comprometida, de ahí la disminución en la capacidad de absorción de carbohidratos, pudiendo asimismo verse afectada de forma más notable la absorción de vitaminas. La disminución en la absorción de la vitamina A ya había sido relacionada con procesos patológicos que interfieren en la absorción de nutrientes, como es la malabsorción a hidratos de carbono, por tanto, en concordancia con nuestros resultados (Khandait *et al.*, 2000; Ponce-Macotella *et al.*, 2008; Quihui *et al.*, 2008; Gil, 2010). Además, como

consecuencia de la falta de vitamina A, se complica la defensa intestinal y se adquiere una mayor predisposición a infecciones por patógenos en el tracto gastrointestinal (Ascensión, 2011).

En relación al posible efecto de la parasitación intestinal por una especie concreta, y considerando el hábitat de parasitación o su poder patógeno, sobre los niveles de vitamina A, se observó que un 51,6% de los afectados por *G. intestinalis* presentaba déficit de esta vitamina, resultando la asociación entre ambas variables estadísticamente significativa. Estos datos coincidían con los de estudios anteriores que ya apuntaban en este sentido (Mahalanabis *et al.*, 1979; Khandait *et al.*, 2000; Latham, 2002; Ponce-Macotela *et al.*, 2008; Quihui *et al.*, 2008; Halliez & Buret, 2013). La giardiosis provoca un acortamiento de las vellosidades y microvellosidades del intestino delgado, una disminución del efecto barrera y de la capacidad de absorción (Ponce-Macotela *et al.*, 2008). Su consecuencia directa es la malabsorción de nutrientes, puesto que esta vitamina liposoluble es absorbida en la parte alta del intestino delgado, concretamente en el duodeno, lugar de adhesión y hábitat de parasitación de *Giardia* (Rivera *et al.*, 2002).

En el análisis para estudiar si la parasitación tenía efecto sobre los niveles de vitamina D ocurrió un hecho inesperado inicialmente, ya que las analíticas mostraron una situación de déficit generalizado en todos los grupos de estudio, por lo que no se pudo evidenciar una asociación significativa del estado de déficit respecto a los procesos infecciosos (Katona *et al.*, 2008). Por lo tanto, no se pudo demostrar que la presencia del parásito tenga un efecto sobre la absorción de la vitamina D, pero sí el hecho de pertenecer al grupo de pacientes y tener síntomas, porque en este caso el déficit era más pronunciado.

Las principales fuentes de vitamina D para el ser humano son la síntesis tras la exposición solar y algunos alimentos como el pescado azul (Gil, 2010). Resulta llamativo el haber detectado una deficiencia generalizada en toda la muestra de estudio para esta vitamina, pues al menos en el grupo de individuos sanos se

esperarían niveles dentro del rango de referencia, ya que no poseen ninguna patología gastrointestinal que pueda interferir en su absorción y se benefician de un clima en el que la exposición solar es usual y esto *a priori* debería ser un factor positivo en la absorción de vitamina D, además de que la población estudiada no pertenece a un contexto en el que las deficiencias nutricionales sean frecuentes.

Al consultar bibliografía reciente al respecto pudimos constatar que, sí existe un déficit general en la población de vitamina D, por tanto, se cree que existen otros factores que podrían alterar su absorción, como por ejemplo la obesidad, puesto que ya existen estudios en que esta podría ser un factor de riesgo para presentar déficit de vitamina D (Antolín *et al.*, 2010). Existen evidencias de que la deficiencia de vitamina D influye en el desarrollo del cáncer, la enfermedad cardiovascular, los procesos autoinmunes y las infecciones. Por otro lado, distintos estudios epidemiológicos avalan un estado de deficiencia o insuficiencia de vitamina D en la población de casi todo el mundo. Ante todos estos datos surgen diferentes controversias, en parte relacionadas con las medidas de fotoprotección impulsadas para prevenir el cáncer cutáneo. Las últimas recomendaciones del Instituto de Medicina Americano consideran que niveles séricos de 20 ng/mL parecen suficientes y alcanzables para la población general, incluso en condiciones de mínima exposición solar. Si atendemos a estas cifras, quizás la prevalencia de esa hipovitaminosis casi pandémica comunicada en los últimos años esté sobreestimada (Gilaberte *et al.*, 2011).

En el grupo de los minerales, no se hallaron diferencias en las medias y medianas entre los grupos y subgrupos de estudio, además de mantenerse todos los valores dentro de los rangos de referencia establecidos. Varios estudios han relacionado la presencia de *G. intestinalis* con un descenso en los valores de ciertos minerales como el hierro o el magnesio (Arbani *et al.*, 2015; Hussein *et al.*, 2016). Sin embargo, debemos tener en cuenta las diferencias de contexto de los estudios realizados hasta el momento, en niños de países empobrecidos, y el del presente estudio, individuos adultos, siendo un sector poblacional de menor riesgo, y en un país desarrollado,

donde la desnutrición y las deficiencias en nutrientes no son tan frecuentes. También cabe reflejar una tendencia actual a la suplementación con complejos vitamínicos y minerales por parte de la población, cuando aparece algún síntoma relacionado o derivado del cansancio, antes de acudir a profesionales sanitario, y buscar el origen de su malestar. Existen estudios donde se ha visto que en jóvenes universitarios la suplementación con complejos vitamínicos asciende hasta el 24% (Guillem *et al.*, 2010), por tanto, aunque en el momento de la extracción sanguínea no estuvieran tomando ningún suplemento, podrían haber tomado alguno en las fechas cercanas a la extracción, y por tanto los valores analíticos podría estar enmascarados.

En cuanto a los marcadores de inflamación/infección analizados, se esperaban valores aumentados en el grupo de los pacientes como consecuencia de un proceso inflamatorio crónico o una parasitosis (Ascensión, 2011), aunque no se ha obtenido ninguna significancia estadística. Tal vez, estos valores se deban al hecho de que la respuesta sistémica puede no reflejar la respuesta local o que su representación sea muy ligera. Otra posible interpretación de los resultados sería que existían en todos los grupos y subgrupos individuos parasitados y no parasitados, y con comorbilidades, por tanto, la elevada diversidad de los resultados ha hecho que la comparación de medias y medianas no haya resultado significativa.

Resultaría pues interesante para un correcto manejo del paciente, realizar una valoración analítica de vitaminas liposolubles a pacientes con giardiosis, con el objetivo de poder minimizar o paliar los efectos secundarios generados.

5.4 FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LAS PARASITOSIS

Otros datos analizados fueron los hábitos, costumbres o situación personal de cada paciente incluido en el estudio que supusiera un riesgo de transmisión o adquisición de los parásitos más frecuentes en nuestro entorno.

Los parámetros analizados fueron recopilados de estudios epidemiológicos sobre parasitosis intestinales en países industrializados (Fletcher *et al.*, 2012; Horton *et al.*, 2018). Entre los potenciales factores de riesgo, se identificaron tres determinantes de la parasitación en países de altas rentas. Los dos primeros factores fueron: la profesión de riesgo por contacto directo con humanos, animales y/o sus excrementos y los viajes a zonas endémicas en los últimos años. Además de los anteriores, el parámetro que destacó sobre los demás por identificarse en una gran proporción de casos de parasitosis fue el consumo habitual de frutas y verdura ecológicas, que cada vez está más en auge en nuestra población, considerándose como la primera causa de parasitosis intestinales en la ciudad de Valencia. Estos vegetales si son ecológicos, suelen ser abonados con excrementos de animales o con aguas de regadío que podrían estar contaminadas fecalmente. Algunos autores en otros estudios consultados, ya apuntaban a la transmisión alimentaria de los parásitos intestinales por contaminación fecal de frutas y verduras (Amorós *et al.*, 2010; Horton *et al.*, 2018; Ryan *et al.*, 2018). Los sujetos consumidores de fruta y verdura ecológica en crudo (lechugas, tomates...) y que además no hacen un lavado adecuado de estos alimentos con lejía alimentaria, podrían incrementar el riesgo a la infección, así mismo se explicó como profilaxis el método a seguir para evitar la infección (Valles *et al.*, 2013).

Consultando estudios similares se vio que los resultados obtenidos coincidían con los de otros autores realizados en países similares como el de Horton *et al.* (2018) en el Reino Unido. Probablemente, por su ciclo directo y el potencial zoonótico de *G. intestinalis* y *Blastocystis* sp., han sido los parásitos más prevalentes en los sujetos estudiados.

Así pues, cabe prestar especial atención a los factores de riesgo descritos por el aumento que ha experimentado en los últimos años la adopción de mascotas y los viajes a países tropicales y subtropicales, y especialmente al consumo de frutas y verduras ecológicas sin lavar adecuadamente, hábito cada vez más en auge en nuestra población, con el fin de evitar infecciones, pues detectándolos en los pacientes

parasitados, se pueden implementar medidas profilácticas para evitar infecciones futuras o reinfecciones.

5.5 ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN PARÁSITOS Y MALABSORCIÓN

Conocida la prevalencia de parásitos intestinales entre la población de estudio y su estado de malabsorción, se analizó la probabilidad que coincidieran ambas situaciones, y se estableció que había relación significativa entre ambas variables, por tanto, una elevada probabilidad de que aquellas personas con parásitos intestinales desarrollarán algún tipo de malabsorción. Se obtuvieron resultados del 40% de pacientes con alguna malabsorción que presentaban parasitosis. Esto ya se había citado ya en estudios anteriores como el realizado por Moya-Camarena *et al.* (2002), en el que citan que la malabsorción puede ser uno de los efectos secundarios intestinales generados por las parasitosis intestinales.

Del total de los pacientes con malabsorción a carbohidratos, la fructosa fue la más frecuente (63,6%). En este contexto, se analizó la probabilidad de padecer malabsorción a fructosa en función de la presencia o no de parásitos intestinales. Para los parásitos de intestino delgado (*G. intestinalis* y *C. parvum*) se detectó una relación significativa entre su presencia y el desarrollo de malabsorción a fructosa, con un riesgo relativo de padecerla doble en relación a los controles sanos.

Revisando la literatura no se han encontrado estudios previos que se refieran concretamente a la relación de *Giardia* con la malabsorción de fructosa, siendo este el primer estudio al respecto. El nexo de unión entre estas dos variables puede que implique a la misma zona intestinal. La colonización de estos parásitos es duodeno-yeyunal, como ya se ha mencionado, y la fructosa se absorbe de forma facilitada por la actividad de un transportador, en concreto GLUT-5 que está presente preferentemente en dicha zona (Riveros *et al.*, 2014). Por tanto, la presencia de dichos parásitos y sus repercusiones inflamatorias podrían ser la causa de que los sujetos estudiados con estas parasitosis desarrollaran malabsorción a fructosa por un déficit o descenso de la actividad de los transportadores.

Cuando se analizó cuál era la probabilidad de padecer malabsorción a lactosa entre los parasitados se obtuvo un 37%, lo cual se encontraba por encima de lo obtenido en los casos negativos (32%). Aun así, la relación establecida entre la parasitación y malabsorción a lactosa no fue estadísticamente significativa, aunque el porcentaje de asociación fuera elevado. Por tanto, no podemos corroborar la relación clásicamente descrita por múltiples autores entre la parasitación por *G. intestinalis* y la malabsorción secundaria a lactosa (Rodrigo 2011), probablemente debido a que también han sido numerosos los casos entre los sujetos no parasitados por otro tipo de afectaciones intestinales no parasitarias.

En cuanto al análisis entre la presencia de *Blastocystis* sp. (parásito del colon) y la malabsorción a fructosa y lactosa, no se pudo confirmar su relación directa. Esto podría ser debido a que su papel patógeno es todavía cuestión de debate, puesto que se ha identificado tanto en sujetos con sintomatología como en asintomaticos, y se piensa que existen otros muchos factores como la microbiota o el estado inmunológico del hospedador que determinan la virulencia o patogenicidad del parásito (Scanlan *et al.*, 2013). Pero también nos hemos planteado que la absorción de azúcares simples se da en intestino delgado y *Blastocystis* sp., es un parásito colónico, por tanto, la localización no coincidiría, tal vez su presencia se deba a una alteración inmunológica intestinal de etiología diversa, que el parásito aprovecha en su vertiente oportunista, pero no se encuentra implicado directamente en el desarrollo del síndrome de malabsorción.

Por tanto, como se ha visto en pacientes con *G. intestinalis* puede verse comprometida su capacidad de absorción a fructosa y por ello se debe implementar medidas dietético-nutricionales para su abordaje encaminadas a minimizar su repercusión a nivel nutricional.

5.6 VALORACIÓN DE LA EFICACIA DE LA TERAPIA COMBINADA

Una vez hechas todas las pruebas diagnósticas procedimos al análisis y manejo de cada caso de forma personalizada según los parásitos y las malabsorciones que presentaban con el objetivo de recobrar la máxima tolerancia posible y con ello normalizar su dieta y mejorar su calidad de vida.

Como se ha comentado anteriormente muchos fueron los fallos terapéuticos detectados en los sujetos parasitados (15%). Se cree que uno de los posibles problemas que se han generado, son el gran número de efectos secundarios de tipo digestivo que estos fármacos provocan, y que, en sujetos con problemas gastrointestinales previos, hayan sido la causa del abandono del tratamiento antes de tiempo (Pérez-Arellano *et al.*, 2007; Abramowicz *et al.*, 2007). Otra posible causa del fallo en la eliminación de los parásitos sería que, debido a la elevada capacidad de absorción del metronidazol vía oral (con valores cercanos al 100%), se va asimilando a lo largo del aparato digestivo, por lo que no llega la totalidad de la dosis al lugar de acción (Vivancos, 2016). Así, la dosis inicial que se debe administrar para alcanzar valores adecuados a nivel intestinal ha de ser elevada y podría generar efectos secundarios desagradables para el paciente. También, al estar la mucosa comprometida puede verse disminuida la capacidad del hospedador para combatir la parasitosis, así como que esta ineficacia farmacológica se deba al uso de este fármaco en el tratamiento de otras infecciones. En general este fármaco se usa para microorganismos anaerobios como *Helicobacter pylori*, o también para infecciones bucales o abscesos en hígado, así como tratamientos empíricos pautados en algunas alteraciones gastrointestinales (SII o SIBO), es por ello que su uso habitual podría generar la aparición de resistencias.

Otro de los posibles inconvenientes que dificulten el éxito terapéutico, sería la posible localización extraintestinal de *G. intestinalis* (Wolfe, 1992), en este tipo de sujetos el fármaco podría no ser efectivo. Finalmente se valoró la posibilidad de reinfección, pero creemos que esta sería difícil, ya que son pacientes que no eliminan de forma constante quistes y fueron informados de las medidas higiénico-sanitarias pertinentes

para evitar la reinfección, aplicables a todos los miembros de la familia por si existiera la posibilidad de la presencia de familiares infectados asintomáticos, por tanto, esta posibilidad queda prácticamente descartada.

Así mismo, la aparición de fallos terapéuticos fue más marcado en aquellos pacientes con déficits inmunológicos de carácter leve como: déficit selectivo de IgA o IgM, trombocitopenias, leucopenias, desnutriciones leves, enfermedades autoinmunes o incluso deportistas de nivel alto-moderado con dietas deficitarias en macro y micronutrientes que con el tiempo y entrenamientos exigentes pueden llevarlos a la inmunosupresión. Por ello, en este tipo de pacientes con su sistema inmunológico comprometido puede complicarse la eliminación parasitaria ya que, aunque el fármaco actúe de forma correcta, el sistema inmunológico del hospedador puede verse limitado para combatir la infección.

Así pues, se hace necesario disponer de fármacos alternativos, y a poder ser de amplio espectro, ya que son frecuentes los multiparasitismos. También sería necesario reducir la agresividad del tratamiento con fármacos de nuevas generaciones con menos efectos adversos puesto que como se ha establecido los fallos terapéuticos en el tratamiento de las enteroparasitosis suelen ser frecuentes.

Tal y como esperábamos las modificaciones en la dieta de forma personalizada resultaron beneficiosas, en mayor o menor grado, en todos los casos. Además, el hallazgo de la parasitosis intestinal significó un cambio drástico en el curso de esta enfermedad pasando de considerarse una enfermedad crónica a una enfermedad con tratamiento específico y definitivo que supondría la curación de la enfermedad parasitaria y secundariamente de la malabsorción. Ello conllevaría una reducción importante en los recursos pues ya no precizaría de seguimiento ni más pruebas diagnósticas porque el paciente estaría libre de síntomas. Así mismo los pacientes, habrán recibido una educación alimentaria, muy importante a largo plazo para disminuir los costes sanitarios de enfermedades consideradas crónicas (diabetes, obesidad, hipertensión, dislipemias...) cada vez más frecuentes y relacionadas con la alimentación.

Así mismo, es importante destacar que cada vez hay más estudios que relacionan la composición de la microbiota intestinal y su funcionalidad con la dieta. Se ha visto que en dietas caracterizadas por una ingesta elevada de grasas y bajo contenido en fibra (dietas muy bajas en frutas y verduras y altas en productos ultra procesados, embutidos, fiambres...) pueden contribuir a una disbiosis en la microbiota intestinal, lo que a su vez puede predisponer a la colonización de microorganismos no beneficiosos para el organismo. Por otra parte, se ha observado que las dietas hiperproteicas, causan una reducción desproporcionada del contenido en un tipo de ácido graso de cadena corta (butirato), correlacionado con un descenso de bacterias beneficiosas (Valdés *et al.*, 2015). Estos ácidos grasos de cadena corta, generados por el consumo de fibra dietética y su degradación bacteriana, ya se han relacionado en algunos estudios (Rodríguez-Cabezas *et al.*, 2002) con la recuperación de la mucosa colónica dañada en enfermedad inflamatoria crónica, ya que constituyen sustratos para el colonocito y, además, disminuyen la respuesta inflamatoria inhibiendo la producción de mediadores proinflamatorios, Factor de Necrosis Tumoral (TNF) y el Óxido Nítrico (NO).

Así pues, por todo ello, cobra especial importancia en pacientes con infecciones gastrointestinales ya instauradas, el tener una alimentación adecuada para minimizar el impacto de esta sobre una microbiota que podría ya estar modificada de base por la infección. De igual manera, es importante, que estos sujetos aun teniendo problemas de malabsorción, no excluyan por completo la fibra dietética (fruta y verdura y otros alimentos de origen vegetal) de su dieta.

Los resultados obtenidos en las pruebas del aliento informan que la recuperación de la absorción de lactosa (15,9%) es más complicada en comparación con la de la fructosa (29,5%) como demuestran las prevalencias de mejoría total tras la intervención. Esto podría ser debido a varias razones. La lactasa, enzima encargada de la hidrólisis del carbohidrato es una molécula inducible, es decir, en el momento en que se deja de ingerir lactosa, el cuerpo humano deja de sintetizar lactasa o viceversa, mientras que vamos incluyendo poco a poco la lactosa en la dieta, el organismo empezara a sintetizar la enzima progresivamente (Brüssow, 2013). Además, en España la

prevalencia de intolerancia genética a lactosa o primaria es habitual, y esta podría ser uno de los condicionantes de la no recuperación de dicha tolerancia, puesto que existen mecanismos genéticos en algunos individuos que hacen imposible esta reversión (Scrimshaw & Murray, 1988).

Por estas razones, la recuperación de la malabsorción de lactosa es un proceso complicado, ya que no solo debe de recuperarse la mucosa para que funcionen los transportadores, sino que además debemos inducir la síntesis de la molécula enzimática. Si a esto le añadimos la aversión que sienten estos pacientes a incluir productos lácteos en su dieta habitual o al nuevo hábito creado por la publicidad de ingerir productos sin lactosa por “su mayor facilidad de digestión” podemos explicar la baja tasa de negativización obtenida (15,9 %). Sin embargo, aquellos pacientes que han seguido las instrucciones dietéticas realizadas en el estudio para reintroducir estos alimentos, refieren que toleran, aunque en pequeñas cantidades, productos que antes no les sentaban bien.

En cambio, la fructosa es un monosacárido que no necesita la acción de una enzima para ser absorbido, aunque si requiere la actividad de su transportador específico (Gibson *et al.*, 2007). Esta variación respecto a la absorción de lactosa podría explicar el mayor número de pacientes en los que la malabsorción desaparece, siendo mucho mayor en la fructosa (29,5%).

Para concretar aún más el estudio, se valoró el efecto de la especie parásita sobre la recuperación de la capacidad de absorción de los pacientes con test de fructosa y lactosa positivo. Se observó una mayor tasa de mejoría de los test en los tiempos iniciales y finales de la terapia de los pacientes con parásitos duodenales respecto a los pacientes con *Blastocystis* sp. con un hábitat alejado del lugar de absorción. Esto podría ser debido, como ya se ha mencionado antes, a la absorción de azúcares simples en parte alta intestinal por ello la capacidad patógena de estas especies genera efectos secundarios justo en la zona de absorción de estos hidratos de carbono simple, pudiendo reducir dicha capacidad (Riveros *et al.*, 2014). No se pueden comparar los

datos obtenidos con otros estudios similares puesto que no se han encontrado referencias previas.

Del mismo modo, se hizo el mismo análisis en el grupo de pacientes que actuaron como control interno y que al no estar parasitados, solo recibieron terapia dietético-nutricional. En ellos no se apreció ninguna mejoría significativa en tiempos pre y post. Las malabsorciones secundarias de aparición en edad adulta pueden tener múltiples orígenes siendo uno de ellos las parasitosis como se ha visto. El no conocer el origen de las malabsorciones de este grupo de pacientes del control interno, creemos que hace más complicado revertir su malabsorción, aunque hayan seguido unas pautas dietéticas específicas y personalizadas como en el grupo de parasitados que sí mejoraron en parte la clínica gastrointestinal inicial, aunque la malabsorción continuó.

A pesar de la eficacia de la intervención propuesta, queda comentar que quedaron parte de los pacientes con *G. intestinalis* sin mejoría significativa tras la aplicación de la terapia combinada. Esto podría ser debido a que las secuelas crónicas asociadas a la giardiosis que incluyen síntomas muy diversos (desde el síndrome del intestino irritable, la fatiga crónica a las manifestaciones extra-intestinales presumiblemente relacionadas con los fenómenos inmunológicos (artritis reactiva, manifestaciones oculares inflamatorias y urticaria)) que no dependen necesariamente de la severidad de las manifestaciones intestinales y pueden persistir incluso más allá de la detección del parásito y su negativización como síndrome postinfeccioso (Bartelt *et al.*, 2015), o tal vez en estos casos la presencia del parásito sea solo la consecuencia de otra causa primaria que haya afectado a la capacidad de defensa de mucosa intestinal y la eliminación del parásito no se suficiente para acabar con esta situación y la malabsorción asociada.

CAPÍTULO SEXTO

CONCLUSIONES

A continuación, se enumeran las principales conclusiones extraídas tras el análisis y discusión de los resultados del estudio.

1. La prevalencia de parasitación es mayor en pacientes con síntomas gastrointestinales, y todavía superior cuando se combinan con síndromes de malabsorción.
2. *G. intestinalis* es el parásito más prevalente en los grupos de pacientes sintomáticos seguido de *Blastocystis* sp.
3. La combinación de técnicas diagnósticas directas e indirectas resulta imprescindible para optimizar el diagnóstico de *G. intestinalis* entre población adulta e inmunocompetente en concreto, y casos crónicos en general.
4. *G. intestinalis* actúa como parásito potencialmente patógeno y responsable de malabsorción a fructosa dada su elevada coexistencia y los significativos niveles de recuperación tras su erradicación.
5. La infección por *G. intestinalis* y los síndromes de malabsorción que frecuentemente la acompañan son responsables de déficits de vitaminas liposolubles, de forma más marcada para el caso de la vitamina A.
6. La vitamina D resultó deficitaria en todos los grupos del estudio, incluido el de individuos control, por ello postulamos que tal vez los rangos de referencia establecidos deban revisarse ante la sospecha de una sobreestimación de la prevalencia de casos deficitarios.
7. El papel patógeno de *Blastocystis* sp. continua siendo controvertido y con nuestros resultados no podemos discernir si su presencia es origen o consecuencia, por su condición de parásito oportunista, de la respuesta inflamatoria a nivel intestinal.

8. Ante el elevado número de casos de parasitosis que quedaron sin controlar, consideramos importante el disponer de nuevos fármacos o pautas de administración alternativas para el tratamiento de las parasitosis intestinales y acompañarse de suplementación o refuerzos inmunitario para mejorar su eficacia.
9. En los pacientes que padecen algún tipo de inmunosupresión o enfermedad autoinmune, las parásitosis tienden a la cronificación resultando más complicado erradicarlas mediante los tratamientos farmacológicos convencionales.
10. La mejoría en la capacidad de absorción en pacientes con parásitos localizados en la parte alta de intestino delgado (*G. intestinalis*) ha sido más patente que con los localizados en intestino grueso (*Blastocystis* sp.).
11. La terapia combinada (farmacológica y nutricional) ha conseguido elevados índices de mejora. Es imprescindible que en la terapia intervenga una dietista-nutricionista que realice el asesoramiento dietético-nutricional personalizado y el seguimiento de los casos.

**REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

A

Abulhasan (M.), Elshazly, (T.A.), Eida, (M.), Albadry, (A.), 2013. *Giardia intestinalis* in patients with nonulcer dyspepsia. Arab Journal of Gastroenterology, 14 (3): 126-129.

Abramowicz, (M), Rizack (M.A.), Goodstein (D), Foucard (A.), Manstein (P.D.), Stegbigel (N.H.), 2007. Drugs for Parasitic Infections. The Medical Letter on Drugs and Therapeutics, 5: e6.

Abramowicz, (M.), 2013. Drugs for Parasitic Infections. New Rochell, New York: 23. The Medical Letter.

Acha (B.) & Szyfres (S.), 2003. Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals: Panamerican Health Organization, Vol 580.

Adiyaman (G.), Dogruman (F.), Mumcuoglu (I), 2015. Investigation of the presence of *Blastocystis* spp. in stool samples with microscopic, culture and molecular methods. Mikrobiyology Bulteni, 49 (1): 85-97.

Ahmed (S.A.), Guerrero Flórez (M.), Karanis (P.), 2018. The impact of water crises and climate changes on the transmission of protozoan parasites in Africa. Pathogens and Global Health, 112 (6): 281-293.

Ali (M.), Rellos (P.), Cox (T.M.), 1998. Hereditary fructose intolerance. Journal of Medical Genetics, 35(5): 353-365.

Alliende (F.), 2007. Intolerancia a la lactosa y otros disacáridos. Gastroenterología Latinoamericana, 18 (2): 152-156.

Alparo (I.), 2005. Giardiasis y desnutrición. Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría, 44 (3): 166-173.

Amaya (A.M.), Trejos (J.), Morales (E.), 2015. *Blastocystis* spp.: revisión literaria de un parásito intestinal altamente prevalente. Revista Universitaria Industrial Santander Salud, 47 (2): 199-208.

Amorós (I.), Alonso (J.L.), Cuesta (G.), 2010. *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts on salad products irrigated with contaminated water. *Journal of Food Protection*, 73 (6): 1138-1140.

Andersen (Y.S.), Gillin (F.D.), Eckmann (L.), 2006. Adaptive immunity-dependent intestinal hypermotility contributes to host defense against *Giardia* spp. *Infection and Immunity*, 74 (4): 2473-2476.

Antolín (S.H.), Martínez (M.D.C.G.), De Frutos (Á.), 2010. Concentraciones deficientes de vitamina D en pacientes con obesidad mórbida. Estudio de caso-control. *Endocrinología y Nutrición*, 57 (6): 256-261.

Arbabi (M.), Esmaili (N.), Parastouei (K.), Hooshyar (H.), Rasti (S.), 2015. Levels of zinc, copper, magnesium elements, and vitamin B12, in sera of schoolchildren with giardiasis and enterobiosis in Kashan, Iran. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 17 (11).

Arpitha (G.M.), Sreekumar (C.), Latha (B.R.), Bharanthi (V. M.), 2018. Prevalence and staining characteristics of *Blastocystis* isolates from food animals in Tamil Nadu. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 11: 61-65.

Ascensión (M.) (ed.), 2011. *Inmunonutrición: En la salud y la enfermedad*. Madrid: Médica Panamericana. 640pp.

Azcona-Gutiérrez (J.M.), de Lucio (A.), Hernández-de-Mingo (M.), García-García (C.), Soriano-Blanco (L.M.), Morales (L.), Aguilera (M.), Fuentes (I.), Carmena (D.), 2017. Molecular diversity and frequency of the diarrheagenic enteric protozoa *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in a hospital setting in Northern Spain. *PLoS One*, 12 (6): e0178575.

B

Baldursson (S.) & Karanis (P.), 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks—an update 2004–2010. *Water Research*, 45 (20): 6603-6614.

Bálint (A.), Dóczy (I.), Bereczki (L.), Gyulai (R.), Szücs (M.), Farkas (K.), Urbán (E.), Nagy (F.), Szepes (Z.), Wittmann (T.), Molnár (T.), 2014. Do not forget the stool examination cutaneous and gastrointestinal manifestations of *Blastocystis* sp. infection. *Parasitology Research*, 113: 1585-1590.

Balsalobre-Arenas (L.) & Alarcón-Cavero (T.), 2017. Diagnóstico rápido de las infecciones del tracto gastrointestinal por parásitos, virus y bacterias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35 (6): 367-376.

Barratt (J.L.), Harkness (J.), Marriott (D.), Ellis (J.T.), Stark (D.), 2011. The ambiguous life of *Dientamoeba fragilis*: the need to investigate current hypotheses on transmission. *Parasitology*, 138 (5): 557-572.

Bartelt (L.A.) & Sartor (R.B.), 2015. Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. *F1000 prime reports*, 7.

Behr (M.A.), Kokoskin (E.), Gyorkos, (T.W.), Cédilotte (L.), Faubert (G.M.), MacLean, (J.D.), 1997. Laboratory diagnosis for *Giardia lamblia* infection: a comparison of microscopy, coprodiagnosis and serology. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 8 (1): 33-38.

Betancourt (W.Q.) & Rose (J.B.) 2004. Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Veterinary Parasitology*, 126 (1): 219-234.

Bijllaardt (W.), Overdeest (I.T.), Buiting (A.G.), Verweij (J.J.), 2014. Rapid clearance of *Giardia lamblia* DNA from the gut after successful treatment. *Clinical Microbiology Infection*, 20: 0972-0974

Bisoffi (Z.), Buonfrate (D.), Montresor (A.), Requena-Mendez (A.), Muñoz (J.), Krolewiecki (A.J.), Gotuzzo (E.), Mena (M.A.), Chiodini (P.L.), Anselmi (M.), Moreira (J.), Albonico (M.), 2013. *Strongyloides stercoralis*: a plea for action: PLoS Neglected Tropical Diseases, 7(5): e2214.

Bolivar (A.M.), Rojas (A.), Lugo (P.G.), 2014. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina*, 3 (1): 25-33.

Brüssow (H.), 2013. Nutrition, population growth and disease: a short history of lactose. *Environmental Microbiology*, 15 (8): 2154-2161.

Buret (A.G.), Hardin (J.A), Olson (M.E.), Gall (D.G.), 1992. Pathophysiology of small intestinal malabsorption in gerbils infected with *Giardia lamblia*. *Gastroenterology*, 103 (2): 506-13.

Buret (A.G), 2005. Immunopathology of giardiasis: the role of lymphocytes in intestinal epithelial injury and malfunction. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100: 185-190.

Buret (A.G.), Amat (C.B.), Manko (A.), Beatty (J.K.), Halliez (M.C.), Bhargava (A.), Cotton (J.A.), 2013. *Giardia duodenalis*: new research developments in pathophysiology, pathogenesis, and virulence factors. *Current Tropical Medicine Reports*, 2 (3): 110-118.

C

Cacciò (S.M.), & Chalmers (R.M.), 2016. Human cryptosporidiosis in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 22 (6): 471-480.

Carmena (D.), Aguinagalde (X.), Zigorraga (C.), Fernández-Crespo (J.C.), Ocio (J.A.), 2007. Presence of *Giardia* cyst and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. *Journal of Applied Microbiology*, 102 (3): 610-629

Cedillo-Rivera (R.), Leal (Y. A.), Yépez-Mulia (L.), Gómez-Delgado (A). Ortega-Pierres (G.), Tapia-Conyer (R.), Muñoz (O.), 2009. Seroepidemiology of giardiasis in Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80 (1): 6-10.

Center of Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta. Giardiasis, 2017. En: <https://www.cdc.gov/parasites/giardia/> (acceso: 09/12/2017).

Center of Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta. *Blastocystis*, 2012. En: <https://www.cdc.gov/parasites/blastocystis/> (acceso: 09/12/2017).

Chahuán (A.), Uslar (N.), Robles (C.), Díaz (L.A.), Hernández-Rocha (C.), 2016. Una dieta baja en FODMAPs disminuye los síntomas del Síndrome de Intestino Irritable. *Gastroenterología latinoamericana*, 27 (1): 62-65.

Chatterjee (A.), Carpentieri (A.), Ratner (D.M.), Bullitt (E.) Costello (C.E.), Robbins (P.W.), Samuelson (J.), 2010. *Giardia* cyst wall protein 1 is a lectin that binds to curled fibrils of the GalNac homopolymer. *Plos Pathogens*, 6 (8): e1001059.

Chen (T.L.), Chen (S.), Wu (H.W.), Lee (T.C.), Lu (Y.Z.), Wu (L.L.), Ni (Y.H.), Sun (C.H.), Yu (W.H.), Buret (A.G.), Yu (L.C.), 2013. Persistent gut barrier damage and comensal bacterial influx following eradication of *Giardia* infection in mice. *Gut Pathogens*, 5 (1): 26.

Cifre (S.), Gozalbo (M.), Ortiz (V.), Soriano (J.M.), Merino (J.F.), Trelis (M.), 2018. *Blastocystis* subtypes and their association with irritable bowel Syndrome. *Medical Hypotheses*, 116: 4-9.

Cordero (R.), Oliver (E.), Martínez (M.A.), Alamillo (A.), 2014. Amebiasis, giardiasis y tricomoniasis. *Medicine*, 11 (54): 3181-3193.

Cordingley (F.T.) & Crawford (G.P.M.), 1986. *Giardia* infection causes vitamin b12 deficiency. *Australian and New Zealand Journal of Medicine*, 16 (1): 78-79.

Cornejo (E.) & Raimann (B.), 2004. Alteraciones del metabolismo de la fructosa. *Revista Chilena de Nutrición*, 31 (2): 93-99.

Cotton (J.A.), Beaty (J.K.), Buret (A.G.), 2011. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *International Journal for Parasitology*, 41: 925-933.

Coyle (C.M.), Varughese (J.), Weiss (L.M.), Tanowitz (H.B.), 2011. *Blastocystis*: To treat or not to treat. *Clinical Infectious Diseases*, 54 (1): 105-110.

D

D'Anchino (M.), Orlando (D.), De Feudis (L.), 2002. *Giardia lamblia* infections become clinically evident by eliciting symptoms of irritable bowel syndrome. *Journal of Infection*, 45 (3): 169-172.

Dawson (S.C.), Sagolla (M.S.), Mancuso (J.J.), Woessner (D.J.), House (S.A.), Fritz-Laylin (L.), Cande, (W.Z.), 2007. Kinesin-13 regulates flagellar, interphase, and mitotic microtubule dynamics in *Giardia intestinalis*. *Eukaryotic Cell*, 6 (12): 2354-2364.

De los Santos Moreno (A.), Cores (P.R.), Navarro (F.), González (J.G.), 2012. Síndrome de malabsorción (II). Enfermedad celíaca. Intolerancia a la lactosa. Sobrecrecimiento bacteriano. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11 (4): 206-213.

De Lucio (A.), Martínez-Ruiz (R.), Merino (F.J.), Bailo (B.), Aguilera H (M.), Fuentes (I.), Carmena (D.) 2015. Molecular genotyping of *Giardia duodenalis* isolates from symptomatic individuals attending two major public hospitals in Madrid, Spain. *PLoS One*, 10 (12): e0143981.

Denoed (F.), Roussel (M.), Noel (B.), Wawrzyniak (I.), Da Silva (C.), Diogonm (M.), Segurens (B.), 2011. Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Genome Biology*, 12 (3): R29.

Díaz (D.P.) & Burgos (L.C.), 2002. How is glucosa transported through cell membrane?. *Iatreia*, 15 (3): 179-189.

Domínguez-Márquez (M.V.), Guna (R.), Muñoz (C.), Gómez-Muñoz (M.T.), Borrás (R.), 2009. High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). *Parasitology Research*, 105 (4): 949.

Douard (V.) & Ferraris (R.P.), 2008. Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 295(2): E227-E237.

E

Einarsson (E.), Troell (K.), Hoepfner (M.P.), Grabherr (M.), Ribacke (U.), Svärd (S.G.), 2016. Coordinated changes in gene expression throughout encystation of *Giardia intestinalis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10 (3): e0004571.

El-Gebaly (N.S.), Halawa (E.F.), Moussa (H.M.), Rabia (I.), Abu-Zekry (M.), 2012. Saliva and sera IgA and IgG in Egyptian *Giardia*-infected children. *Parasitology Research*, 111: 571-575.

European Centre for Disease Prevention Control (ECDC). Report 2013. En: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/publications/annual-epidemiological> (Acceso: 17 /03/2019).

European Food Safety Authority (EFSA). Brogliaa (A.), Kapelb (C.), Palli (L.N.), 2011. Changing dietary habits in a changing world: Emerging drivers for the transmission of foodborne parasitic zoonoses. *Veterinary Parasitology*, 182: 2– 13.

F

Fajardo (O.), Naim (H.Y.), Lacey (S.W.), 1994. The polymorphic expression of lactase in adults is regulated at the messenger RNA level. *Gastroenterology*, 106 (5): 1233-1241.

Farthing (M.J.), 1996. Giardiasis. *Gastroenterology Clinics*, 25 (3): 493-515.

Farthing (M.J.), 1997. The molecular pathogenesis of giardiasis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 24 (1): 79-88.

Fayer (R.) & Xiao (L.), 2007. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis, Second edition. CRC Press Taylor & Francis Group. New York, 576 pp.

Fedewa (A.) & Rao (S.S.), 2014. Dietary fructose intolerance, fructan intolerance and FODMAPs. *Current Gastroenterology Reports*, 16 (1): 370.

Feng (Y.) & Xiao (L.), 2011. Zoonotic Potencial and Molecular Epidemiology of *Giardia* Species and Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 24 (1): 110-140.

Fernández-Bañares (F.), Esteve (M.), Viver (J.M.), 2009. Fructose-sorbitol malabsorption. *Current Gastroenterology Reports*, 11 (5): 368-374.

Filice (F.P.), 1952. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. *University of California Publications in Zoology*, 57: 53-146.

Fink (M.Y.) & Singer (S.M.), 2017. The intersection of immune responses, microbiota, and pathogenesis in giardiasis. *Trends in Parasitology*, 33 (11): 901-913.

Flecha (M.J.), Benavides (C.M.), Tissiano (G.), Tesfamariam (A.), Cuadros (J.), de Lucio (A.), Carmena (D.), 2015. Detection and molecular characterisation of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. and *Entamoeba* spp. among patients with gastrointestinal symptoms in Gambo Hospital, Oromia Region, southern Ethiopia. *Tropical Medicine & International Health*, 20 (9): 1213-1222.

Fletcher (S.M.), Stark (D.), Harkness (J.), Ellis (J.), 2012. Enteric Protozoa in the Developed World: a Public Health Perspective. *Clinical Microbiology Reviews*, 25: 420-449.

Fonte (L.) & Almannoni (S.A.), 2009. Giadiasis entre realidades y mitos. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 7 (2),

Formenti (F.), Valerio (M.), Guerriero (M.), Perandin (F.), Pajola (B.), Mistretta (M.), Bisoffi, (Z.), 2017. Molecular biology can change the classic laboratory approach for intestinal protozoan infections. *Frontiers in Microbiology*, 8: 2191.

Fos (S.), Vendrell (E.), Minardi (R.), Morales (M.), Llopis (A.), 2000. Enfermedades parasitarias de origen alimentario más frecuentes en España: incidencia y comparación con las de origen vírico y bacteriano. *Ars Pharmaceutica*, 41 (3): 293-305.

Fouad (S A), Esmat, (S.), Basyoni, (M.M.), Farhan, (M.S.), Kobaisi, (M.H.), 2014. Molecular identification of *Giardia intestinalis* in patients with dyspepsia. *Digestion*, 90 (1): 63-71.

G

Gargantini (P.R.), del Carmen (M.), Ríos (D.N), Tenaglia (A.H.), Lujan (H.D.), 2016. Antigenic variation in the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Current opinión in Microbiology*, 32: 52-58.

Gentekaki (E.) Curtis (B.A.), Stairs (C.W.), Klimes (V.), Elias (M.), Salas-Leiva (D.E.), Hilliou (F.), 2017. Extreme genome diversity in the hyper-prevalent parasitic eukaryote *Blastocystis*. *PLoS Biology*, 15 (9): e2003769.

Ghosh (S.), Debnath (A.), Sil (A.), De (S.), Chattopadhyay (D.J.), Das (P.), 2000. PCR detection of *Giardia lamblia* in stool: targeting intergenic spacer region of multicopy rRNA gene. *Molecular and Cellular Probes*, 14 (3): 181-189.

Ghosal (U.), 2011. How to interpret Hydrogen Breath Test. *Journal Neurogastroenterology and Motility*, 17 (3): 312-317.

Gibson (P.R.), Newnham (E.), Barrett (J.S.), Shepherd (S.J.), Muir (J.G.), 2007. Review article: fructose malabsorption and the bigger picture. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 25: 349-363.

Gil (Á.) & Sánchez de Medina Contreras (F.), 2010. Tratado de nutrición (No. 612.39). Médica Panamericana. 3980 pp.

Gilaberte (Y.), Aguilera (J.), Carrascosa, (J.M.), Figueroa (F.L.), de Gabriel (J.R.), Nagore (E.), 2011. La vitamina D: evidencias y controversias. *Actas Dermo-sifiliográficas*, 102 (8): 572-588.

Ginard (D.), Riera (J.), Bonet (L.), Barranco (L.), Reyes (J.), Escarda (A.), Obrador (A.), (2003). Malabsorción de lactosa en la colitis ulcerosa. Estudio de casos y controles. *Gastroenterología y Hepatología*, 26 (8): 469-474.

Grazioli (B.), Matera (G.), Laratta (C.), Schipani (G.), Guarnieri (G.), Spiniello (E.), Imeneo (M.), Amorosi (A.), Focà (A.), Luzzza (F.), 2006. *Giardia lamblia* infection in patients with irritable bowel syndrome and dyspepsia: A prospective study. *World Journal of Gastroenterology*, 12: 1941-1944.

Guillem (P.), Francès (F.), Gimenez (F.), Sáiz (C.), 2010. Estudio sobre automedicación en población universitaria española. *Revista Clínica de Medicina de Familia*, 3 (2): 99-103.

Guyton (A.C.) & Hall (J.E.), 2001. Principios generales de la función gastrointestinal: Motilidad, control nervioso y circulación sanguínea. *Tratado de fisiología médica*. 10ª Edición. México: McGraw-Hill Interamericana, p. 865-975.

H

Halliday (C.E.W.), Clark (C.), Farthing (M.J.G.), 1988. *Giardia*-bile salt interactions *in vitro* and *in vivo*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 82 (3): 428-432.

Halliez (M.C.) & Buret (A.G.), 2013. Extra-intestinal and long-term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World Journal of Gastroenterology*, 47: 8974-85.

Hanevik (K.), Dizdar (V.), Langeland (N.), Hausken, (T.), 2009. Development of functional gastrointestinal disorders after *Giardia lamblia* infection. *BMC Gastroenterology*, 9 (1): 27.

Hamilton (L.H.), 1998. Interpreting lactose malabsorption breath-tests. *Breath tests and gastroenterology* (ed Second edition). Milwaukee: QuinTron Instruments Company, 37-47.

Hammer (V.), Hammer (K.), Memaran (N.), Huber (W.D.), Hammer (K.), Hammer (J.), 2018. Relationship between abdominal symptoms and fructose ingestion in children with chronic abdominal pain. *Digestive Disease and Science*, 63 (5): 1270-1279.

Hassan (S.M.T.), Maachee (M.), Cordova (O.M.), de la Guardia (R.D.), Martins (M.), Osuna (A.), 2002. Human secretory immune response to fatty acid-binding protein fraction from *Giardia lamblia*. *Infection and immunity*, 70 (4): 2226-2229.

Hassan (M.M.), Afify (H.), Abdel-Ghaffar (M.), Dyab (A.K.), Hassounah (O.), Salaeh (A.), Dawood (M.M.), 2002. Detection of *E. histolytica*, *G. lamblia* and *Cryptosporidium* copro-antigens in stool samples. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 32 (1): 191-200.

Hassan (S.T.), Maache (M.), de la Guardia (R.D.), Cordova (O.M.), García (J G.), Galiana (M.), Osuna (A.), 2005. Binding properties and immunolocalization of a fatty acid-binding protein in *Giardia lamblia*. *Journal of Parasitology*, 91 (2): 284-293.

Heyman (M.B.), 2006. Lactose intolerance in infants, children and adolescents. *Pediatrics*, 118 (3): 1279-1286

Hinojosa-Guadix (J.H.), Gamarro (M.P.), Sánchez (I.M.), 2017. Malabsorción e intolerancia a la fructosa: fructosa-sorbitol en patología funcional. *Revista Andaluza de Patología Digestiva*, 40 (3): 119-124.

Holberton (D.V.), Ward (A.P.), 1981. Isolation of the cytoskeleton from *Giardia*. Tubulin and a low-molecular-weight protein associated with microribbon structures. *Journal of Cell Science*, 47 (1): 139-166.

Homan (W.L.) & Mank (T.G.), 1991. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *International Journal for Parasitology*, 31 (8): 822-826.

Hopkins (R.M), Deplazes (P.), Meloni (B.P.), Reynoldson (J.A.), Thompson (R. C. A.), 1993. A field and laboratory evaluation of a commercial ELISA for the detection of *Giardia* coproantigens in humans and dogs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87 (1): 39-41.

Horton (B.), Bridle (H.), Alexander (C.L.), Katzer (F.), 2018. *Giardia duodenalis* in the UK: current knowledge of risk factors and public health implications. *International Journal for Parasitology*, 35 (11-12): 1181-1190.

Huamán (J.W.), Felip (A.), Guedea (E.), Jansana (M.), Videla (S.), Saperas (E.), 2015. The diet low in fermentable carbohydrates short chain and polyols improves symptoms in patients with functional gastrointestinal disorders in Spain. *Gastroenterología y Hepatología*, 38 (3): 113-122.

Huang (D.B.), Chapell (C.), Okhuysen (P.), 2004. Cryptosporidiosis in Children. *Seminars in Pediatric Infectious Disease*, 15: 253-259.

Hussein (E.M.), Zaki (W.M.), Ahmed (S.A.), Almatary (A.M.), Nemr (N.I.), Hussein (A.M.), 2016. Predominance of *Giardia lamblia* assemblage A among iron deficiency anaemic pre-school Egyptian children. *Parasitology Research*, 115 (4): 1537-1545.

I

Inmuno & molecular Diagnostics. Operon®. En: <http://www.operon.es/> (acceso: 3/06/2016).

Infante (D.), 2008. Intolerancia a la lactosa: en quién y por qué. *Anales de Pediatría*, 69 (2): 103-105.

J

Jokipii (L.), Miettinen (O.), Jokipii (A.M.), 1988. Antibodies to cysts of *Giardia lamblia* in primary giardiasis and in the absence of giardiasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 26 (1): 121-125.

Jones (H.F.), Butler (R.N.), Brooks (D.A.), 2010. Intestinal fructose transport and malabsorption in humans. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 300 (2): G202-G206.

K

Khandait (D.W.), Vasudeo, (N.D.), Zodpey (S.P.), Kumbhalkar, (D.T.), 2000. Brief report. Risk factors for subclinical vitamin A deficiency in children under the age of 6 years. *Journal of Tropical Pediatrics*, 46 (4): 239-241.

Karanis (P.), Kourenti (C.), Smith (H.), 2007. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *Journal of Water and Health*, 5 (1): 1-31.

Katona (P.) & Katona-Apte (J.), 2008. The interaction between nutrition and infection. *Clinical Infectious Diseases*, 46 (10): 1582-1588.

Keister (D.B.), 1983. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77 (4): 487-488.

Kent (G.P.), Greenspan J (R.), Herndon (J.L.), Mofenson (L.M.), Harris (J.A.), Eng (T.R.), Waskin (H.A.), 1988. Epidemic giardiasis caused by a contaminated public water supply. *American Journal of Public Health*, 78 (2): 139-143.

Keselman (A.), Li (E.), Maloney (J.), Singer (S.M.), 2016. The microbiota contributes to CD8+ T cell activation and nutrient malabsorption following intestinal infection with *Giardia duodenalis*. *Infection and Immunity*, 84 (10): 2853-2860.

Kim (J.), Bae (S.S.), Sung (M.H.), Lee (K.H.), Park (S.J.), 2009. Comparative proteomic analysis of trophozoites versus cysts of *Giardia lamblia*. *Parasitology Research*, 104 (2): 475.

Klein (D.) 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8 (6): 257-260.

Koehler (A.V.), Jex (A.R.), Haydon (S.R.), Stevens (M.A.), Gasser (R.B). 2014. *Giardia*/giardiasis-A perspective on diagnostic and analytical tools. *Biotechnology Advances*, 32 (2): 280-289

Kolisko (M.), Cepicka (I.), Hampl (V.), Kulda (J.), Flegr (J.), 2005. The phylogenetic position of enteromonads: a challenge for the present models of diplomonad evolution. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55 (4): 1729-1733.

Korpe (P.S.), Liu (Y.), Siddique (A.), Kabir (M.), Ralston (K.), Ma (J.Z.), Petri Jr (W.A.), 2012. Breast milk parasite-specific antibodies and protection from amebiasis and cryptosporidiosis in Bangladeshi infants: a prospective cohort study. *Clinical Infectious Diseases*, 56 (7): 988-992.

Kotton (C.N.), Sexton (D.J.), McGovern (B.H.), 2010. Zoonoses from dogs. En: <http://www.uptodate.com/online> (acceso: 07/01/2016).

Kotton (C.N.), Sexton (D.J.), McGovern (B.H.), 2017. Zoonoses from cats. En: <http://www.uptodate.com/online> (acceso: 07/01/2016).

Kurt (Ö.) & Tanyüksel (M.), 2016. Eradication of *Blastocystis* in humans: Really necessary for all. *Parasitology International*, 65 (6): 797-801.

L

Lalle (M.), Pozio (E.), Capelli (G.), Bruschi (F.), Crotti (D.), Caccio (S.M.), 2005. Genetic heterogeneity at the β -giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *International Journal for Parasitology*, 35 (2): 207-213.

Lara (J.C.), Moliner (M.B.), Gozalbo (M.), Manrique (I.), Oliver (C.P.), Cifre (A.S.), Sanchis (J.E.), 2010. Parasitosis intestinales en escolares de la ciudad de Valencia. Encuesta de prevalencia. *Boletín Epidemiológico Semanal*, 18 (7): 69-72.

Latham (M.C.), 2002. *Nutrición Humana en el Mundo en Desarrollo: Volumen 29*. Roma: FAO.

Li (E.), Zhao (A.), Shea-Donohue (T.), Singer (S.M.), 2007. Mast cell-mediated changes in smooth muscle contractility during mouse giardiasis. *Infection and Immunity*, 75 (9): 4514-4518.

Lindshield (B.L.) & Adhikari (K.), 2013. Online and campus college students like using an open educational resource instead of a traditional textbook. *Journal of Online Learning and Teaching*, 9 (1): 26-38.

López-Rodríguez (M.J.) & Pérez (M.D.), 2011. Parasitosis intestinales. *Anales de Pediatría Continental*, 9 (4): 249-58.

Luján (H D.) & Svärd (S.) (eds.), 2011. *Giardia: A model organism*. Springer Science & Business Media. 436 pp.

Losada-Ocaña (C.), Cuenca-Gómez (J.A.), Cabezas-Fernández (M.T.), Vázquez-Villegas (J.), Soriano-Pérez, (M.J.), Cabeza-Barrera (I.), Salas-Coronas (J.), 2018. Clinical and epidemiological characteristics of intestinal parasite infection by *Blastocystis hominis*. *Revista Clínica Española (English Edition)*, 218 (3): 115-120.

M

Macpherson (C.N.), Gottsetein (B.), Geerts (S.), 2000. Parasitic food-borne and water-borne zoonoses. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 19 (1): 240-258.

Mahalanabis (D.), Simpson (T.W.), Chakraborty (M.L.), Ganguli (C.), Bhattacharjee (A K.), Mukherjee, (K.L.), 1979. Malabsorption of water miscible vitamin A in children with giardiasis and ascariasis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 32 (2): 313-318.

Mateo (M.), de Mingo (M.H.), de Lucio (A.), Morales (L.), Balseiro (A.), Espí (A.), Bernal (R.C.), 2017. Occurrence and molecular genotyping of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in wild mesocarnivores in Spain. *Veterinary Parasitology*, 235: 86-93.

Mayrhofer (G.), Andrews (R.H.), Ey (P.L), Chilton (N.B.), 1995. Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. *Parasitology*, 111 (1): 11-17.

Minetti (C.), Lamden (K.), Durband (C.), Cheesbrough (J.), Platt (K.), Charlett (A.), Wastling (J.M.) 2015. Case-control study of risk factors for sporadic giardiasis and parasite assemblages in North West England. *Journal of Clinical Microbiology*, 53 (10): 3133-3140.

Mohammed (S.R.), Faubert (G.M.), 1995. Disaccharidase deficiencies in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) protected against *Giardia lamblia*. *Parasitology Research*, 81 (7): 582-590.

Morrison (H.G.), McArthur (A.G.), Gillin (F.D.), Aley (S.B.), Adam (R.D.), Olsen (G.J.), Davids (B.J.), 2007. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science*, 317 (5846): 1921-1926.

Moya-Camarena (S.Y.), Sotelo (N.), Valencia (M.E.), 2002. Effects of asymptomatic *Giardia intestinalis* infection on carbohydrate absorption in well-nourished Mexican children. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66: 255-259.

N

Naghavi (M.), Abajobir (A.A.), Abbafati (C.), Abbas (K.M.), Abd-Allah (F.), Abera (S.F.), Ahmadi (A.), 2017. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet*, 390 (10100): 1151-1210.

Nash (T.E.), McCutchan (T.), Keister (D.), Dame (J.B.), Conrad (J.D.), Gillin (F.D.), 1985. Restriction-endonuclease analysis of DNA from 15 *Giardia* isolates obtained from humans and animals. *Journal of Infectious Diseases*, 152 (1): 64-73.

Nygard (K.), Schimmer (B.), Sobstad (O.), Walde (A.), Tveit (I.), Langeland (N.), Hausken (T.), Aavistsland (P.), 2006. A large community outbreak of waterborne giardiasis-delayed detection in a nonendemic urban area. *BMC Public Health*, 6 (1): 141.

O

Odoi (A.), Martin (S.W.), Michel (P.), Holt (J.), Middleton (D.), Wilson (J.), 2004. Determinants of the geographical distribution of endemic giardiasis in Ontario, Canada: a spatial modelling approach. *Epidemiology and Infection*, 132: 967-976.

Ögren (J.), Van Nguyen (S.), Nguyen (M.K.), Dimberg (J.), Matussek (A.), 2016. Prevalence of *Dientamoeba fragilis*, *Giardia duodenalis*, *Entamoeba histolytica/dispar*, and *Cryptosporidium* spp in Da Nang, Vietnam, detected by a multiplex real-time PCR. *Apmis*, 124 (6): 529-533.

Onbasi (K.), Günşar (F.), Sin (A.Z.), Ardeniz (O.), Kokuludağ (A.), Sebik (F.), 2005. Common variable immunodeficiency (CVID) presenting with malabsorption due to giardiasis. *The Turkish journal of gastroenterology: the official journal of Turkish Society of Gastroenterology*, 16 (2): 111-113.

Organización Mundial de la Salud (OMS, WHO), 2013. Anual reporting: Initiative to Estimate the Global Burden of Foodborne Diseases. En: <http://www.who.int/research/es/> (acceso: 03/6/2019).

Organización Mundial de la Salud (OMS, WHO), 2015. Zoonoses. En: <https://www.who.int/zoonoses/en/> (acceso: 03/6/2019).

P

Parija (S.C.) & Jeremiah (S.S.), 2013. *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence. *Tropical Parasitology*, 3 (1): 17.

Paulos (S.), Koster (P.C.), de Lucio (A.), Hernández-de-Mingo (M.), Cardona (G.A.), Fernández-Crespo (J.C.), Carmena (D.), 2018. Occurrence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in humans, dogs and cats sharing household in northern Spain and assessment of zoonotic transmission risk. *Zoonosis and Public Health*, 65 (8): 993-1002.

Pérez-Molina (J.A.), Díaz-Menéndez (M.), Pérez-Ayala (A.), Ferrere (F.), Monje (B.), Norman (F.), López-Vélez (R.), 2010. Tratamiento de las enfermedades causadas por parásitos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28 (1): 44-59.

Pettoello (M.M.), Guandalini (S.), Ecuba (P.), Corvino (C.), 1989. Lactose malabsorption in children with symptomatic *Giardia lamblia* infection: feasibility of yogurt supplementation. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 9 (3): 295-300.

Ponce-Macotela (M.), González-Maciél (A.), Reynoso-Robles (R.), Martínez-Gordillo (M.N.), 2008. Goblet cells: are they an unspecific barrier against *Giardia intestinalis* or a gate. *Parasitology Research*, 102 (3): 509-513.

Q

Quihui (C.), Astiazarán-García (V.), Morales (F.), Lopez (M.), Ortiz (V.), 2008. Impact of *Giardia intestinalis* on vitamin A status in schoolchildren from northwest Mexico. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 78 (2): 51-56.

R

Read (C.M.), Monis (P.T.), Thompson (R.A.), 2004. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infection, Genetics and Evolution*, 4 (2): 125-130.

Red Nacional de Epidemiología. Centro Nacional de Epidemiología. Año epidemiológico 2017: Entre el 2 de enero y el 31 de enero del 2017. En: <http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=25/01/2019-d8ee271b6f> (acceso: 06/05/2018).

Reyes-Huerta (J.U.), De la Cruz-Patiño (E.), Ramírez-Gutiérrez de Velasco (A.), Zamundo (C.), Remes-Troche (J.M.), 2010. Intolerancia a la fructosa en pacientes con síndrome de intestino irritable; un estudio de casos y controles. *Revista de Gastroenterología de México*, 4: 405-411.

- Reynoso-Robles (R.), Ponce-Macotela (M.), Rosas-López (L.E.), Ramos-Morales (A.), Martínez-Gordillo (M.N.), González-Maciel (A.), 2015. The invasive potential of *Giardia intestinalis* in an *in vivo* model. Scientific reports, 5: 15168.
- Rivera (M.), de la Parte (M.A.), Hurtado (P.), Magaldi (L.), Collazo (M.), 2002. Giardiasis intestinal. Mini-revisión. Investigación Clínica, 43 (2): 119-128.
- Riveros (M.J.), Parada (A.), Pettinelli (P.), 2014. Consumo de fructosa y sus implicaciones para la salud: malabsorción de fructosa e hígado graso no alcohólico. Nutrición Hospitalaria, 29 (3): 491-499.
- Roberts (T.), Stark (D.), Harkness (J.), Ellis (J.), 2014. Update on the pathogenic potencial and treatment options for *Blastocystis* sp. Gut Pathogens, 6 (1): 17.
- Rodrigo (M. A.), 2011. Parasitosis intestinales. Pediatría Integral, XV (2): 141-153.
- Rodrigo (L.) & Riestra (S.), 2007. Dieta y cáncer de colon. Revista Española de Enfermedades Digestivas, 99 (4): 183-189.
- Rodríguez (O.L), Hagel (I), González (Y.), Roque (M.E.), Vásquez (N.), López (E.), Di Prisco (M.C.), 2004. Secretory IgA antibody responses in Venezuelan children infected with *Giardia duodenalis*. Journal of Tropical Pediatrics, 50 (2): 68-72.
- Rodríguez-Cabezas (M.E.) Galvez (J.), Lorente (M.D.), Concha (A.), Camuesco (D.), Azzouz (S.), Osuna (A.), Redondo (L.), Zarzuelo (A.), 2002. Dietary fiber down-regulates colonic tumor necrosis factor α and nitric oxide production in trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitic rats. The Journal of Nutrition, 132 (11): 3263-3271
- Rosa-Jiménez (F.), Montijano (A.M.), Ília (C.), Zambrana (J.L.), 2005. ¿Solicitan las mujeres más consultas al área médica que los hombres? Anales de Medicina Interna, 22 (11): 515-519.

Rosales-Borjas (D.M.), Díaz-Rivadeneira (J.), Doña-Leyva (A.), Zambrano-Villa, (S.A.), Mascaró (C.), Osuna (A.), Ortiz-Ortiz (L.), 1998. Secretory immune response to membrane antigens during *Giardia lamblia* infection in humans. *Infection and Immunity*, 66 (2): 756-759.

Roxström-Lindquist (K.), Palm (D.), Reiner (E.), Svärd (S.G.) 2006, *Giardia* immunity- an update. *Review Trends in Parasitology*, 22 (1): 26-31.

Rubio (M.A.), 2002. Implicaciones de la fibra en distintas patologías. *Nutrición Hospitalaria*, 17 (2): 17-29.

Ryan (U.) & Cacciò (S.M.), 2013. Zoonotic potential of *Giardia*. *International Journal for Parasitology*, 43 (12-13): 943-956.

Ryan (U.), Hijjawi (N.), Feng (Y.), Xiao (L.), 2018. *Giardia*: an under-reported foodborne parasite. *International Journal for Parasitology*, 49 (1): 1-11.

S

Sánchez (R.), Martín (M.), Palma Milla (S.) López (B.) Bermejo (L.M.), Gómez (C.), 2015. Indicaciones de diferentes tipos de fibra en distintas patologías. *Nutrición Hospitalaria*, 31 (6): 2372-2383.

Sánchez-Gutiérrez (J.C.), Benlloch (T.), Leal (M.A.), Samper (B.), García-Ripoll (I.), Felú (J.E.), 2002. Molecular analysis of the aldolase B gene in patients with hereditary fructose intolerance from Spain. *Journal of Medical Genetics*, 39 (9): e56-e56.

Sánchez-Ovejero (C.), Benito-López (F.), Díe (P.), Casulli (A.), Siles-Lucas (M.), Fuentes (M.), Manzano-Román (R.), 2016. Sensing Parasites: Proteomic and Advances bio detection alternatives. *Journal of Proteomics*, 136: 145-156

Satoskar (A.R.), Simon (G.L), Hotez (P.J.), Tsuji (M.), 2009. *Cryptosporidiosis. Medical Parasitology. Vademecum, Landes Bioscience, Austin, Texas USA.*

Savioli (L.), Smith (H.), Thompson (A.), 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* Join the Neglected Diseases Initiative. *Trends in Parasitology*, 22 (5): 203-208.

Scanlan (P.D.) & Stensvold (C.R), 2013. *Blastocystis*: getting to grips with our guileful guest. *Trends in Parasitology*, 29 (11): 523-9.

Scrimshaw (N.S.) & Murray (E.B.), 1988. The acceptability of milk and milk products in populations with a high prevalence of lactose intolerance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 48 (4): 1142-1159.

Scott (K.G.E.), Linda (C.H.), Buret (A.G.), 2004. Role of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. *Infection and Immunity*, 72 (6): 3536-3542.

Silva (R.K.), Pacheco (F.T.), Martins (A.S.), Menezes (J.F.), Costa-Ribeiro Jr (H.), Ribeiro (T.C.), Teixeira (M.C.), 2016. Performance of microscopy and ELISA for diagnosing *Giardia duodenalis* infection in different pediatric groups. *Parasitology International*, 65 (6): 635-640.

Silberman (J.D.), Sogin (M.L.), Leipe (D D.), Clark (C.G.), 1996. Human parasite finds taxonomic home. *Nature*, 380 (6573): 398.

Singer (S.M.) & Nash (T.E), 2000. T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. *Infection and Immunity*, 68 (1): 170-175.

Solano (L.), Acuña (I.), Barón (M.A.), Morón de Salim (A.), Sánchez (A.), 2008. Influencia de las parasitosis intestinales y otros antecedentes infecciosos sobre el estatus nutricional antropométrico de niños en situación de pobreza. *Parasitología Latinoamericana*, 63: 12-19.

Solomons (N.W.), Hamilton (L.H.), Christman (N.T.), Rothman (D.), 1983. Evaluation of a rapid breath hydrogen analyzer for clinical studies of carbohydrate absorption. *Digestive Diseases and Sciences*, 28 (5): 397-404.

Soto (J.M.) & Dreiling (D.A), 1977. *Giardia lamblia*. *American Journal of Gastroenterology*, 67 (3).

Stark (D.), Beebe (N.), Marriott (D.), Ellis (J.), Harkness (J.), 2006. Evaluation of three diagnostic methods, including Real-Time PCR, for Detection of *Dientamoeba fragilis* in stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 232-235.

Stark (D.), Van Hal (S.), Marriott (D.), Ellis (J.), Harkness (J.), 2007. Irritable bowel syndrome: a review on the role of intestinal protozoa and the importance of their detection and diagnosis. *International Journal for Parasitology*, 37: 11-20.

Stenvold (C.R), Suresh (G.K.), Tan (K.S.), Thompson (R.C.), Traub (R.J.), Viscogliosi (E.), Clark (C.G.), 2007. Terminology for *Blastocystis* subtypes-a consensus. *Trends in Parasitology*, 23 (3): 93-6.

Subirats (M.) & Borràs (R.), 2018. Un parásito emergente de patogenicidad controvertida. *Blastocystis* sp: ¿Hay que tartar a todos los pacientes? *Revista Clínica Española*, 218 (3): 133-134.

Sugaya (N.), Otsuka (J.), 2002. The lineage-specific base-pair contents in the stem regions of ribosomal RNAs and their influence on the estimation of evolutionary distances. *Journal of Molecular Evolution*, 55 (5): 584-594.

Swallow (D.M.), 2003. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annual Reviews of Genetics*, 37 (1): 197-219.

T

Tajada (P.), Bohígas (C.), García (M.), Tobar (M.), Pérez (F.), Sacristán (B.), Hernández (B.), Cobo (M.J.), Fragoso (M.A.), Jiménez (M.A.), 2002. Estudio epidemiológico de las parasitosis intestinales 2000-2001 en poblaciones ambulatorias del Área 1 de la Comunidad de Madrid. *Análisis Clínicos*, 27(2): 47-58.

Tellez (A.), Winiacka-krusnell (J.), Paniagua (M.), Linder (E.), 2003. Antibodies in mother's milk protect children against giardiasis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 35 (5): 322-325.

Téllez (A.), Palm (D.), Weiland (M.), Alernan (J.), Winiacka-Krusnell (J.), Linder (E.), Svärd (S.), 2005. Secretory antibodies against *Giardia intestinalis* in lactating Nicaraguan women. *Parasite Immunology*, 27 (5): 163-169.

Troeger (H.), Epple (H.J), Schneider (T.), Wahnschaffe (U.), Ullrich (R.), Burchard (G.D.), Jelinek (T.), Zeitz (M.), Fromm (M.), Schulzke (J.D.), 2007. Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *International Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 56: 328- 335.

Tungtrongchitr (A.), Manatsathit (S.), Kositchaiwat (C.), Ongrotchanakun (J.), Munkong (N.), Chinabutr (P.), Chaicumpa (W.), 2004. *Blastocystis hominis* infection in irritable bowel syndrome patients. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 35: 705-710.

Turkeltaub (J.A.), McCarty (T.R.), Hotez (P.J.), 2015. The intestinal protozoa: emerging impact on global health and development. *Current Opinion in Gastroenterology*, 31 (1): 38-44.

U

Ugras (M.) & Miman (O.), 2013. The prevalence of intestinal parasites in children with *Helicobacter pylori* gastritis evaluated retrospectively. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 37 (4): 245.

V

Valdés (B.), María, (J.), Valdés (M.D.C.), Miyar Pieiga (E.), Linares Valdés (H.), Martínez (A.), 2015. Alteraciones en el microbiota intestinal por la dieta y su repercusión en la génesis de la obesidad. *Medisan*, 19 (12): 1536-1546.

Valles (L.E.T.), Salas (A.), Lozada (C.), Cárdenas (E.), Martín (J.), Agobian (G.), 2013. Detección de enteroparásitos en lechugas que se comercializan en el estado Lara, Venezuela. *Luz y Vida: Revista Médico-Científica*, 4 (1): 7-11.

Vazquez Tsuji (O.) & Campos Rivera (T.), 2009. La parasitosis más frecuente a nivel mundial. *Revista del Centro de Investigación-Universidad La Salle de México*, 8: 75-90.

Vega-Franco (L.), Meza (C.), Romero (J.L.), Alanis (S.E.), Meijerink (J), 1987. Breath hydrogen test in children with giardiasis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 6 (3): 365-368.

Vivancos Gómez V, 2016. Estudio de la modificación en la absorción de fármacos en giardiasis y nuevas estrategias de formulación. Tesis doctoral, Universitat de València, 296 pp.

Vos (T.), Abajobir (A.A.), Abate (K H.), Abbafati (C.), Abbas (K.M.), Abd-Allah (F.), Aboyans (V.), 2017. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet*, 390 (10100): 1211-1259.

W

Walterspiel (J.N.), Morrow (A.L.), Pickering (L.K.), Ruiz-Palacios (G.M.), Guerrero (M.L.), 1994. Secretory anti-*Giardia lamblia* antibodies in human milk: protective effect against diarrhea. *Pediatrics*, 93(1): 28-31.

Wawrzyniak (I.), Courtine (D.), Osman (M.), Hubans-Pierlot (C.), Cian (A.), Nourrisson (C.), Delgado-Viscogliosi (P.), 2015. Draft genome sequence of the intestinal parasite *Blastocystis* subtype 4-isolate WR1. *Genomics Data*, 4: 22.

Wilder-Smith (C.H), Li (X.), Ho (S.S.), Leong (S.M.), Wong (R.K.), Koay (E.S.), Ferraris (R.P.), 2014. Fructose transporters GLUT-5 and GLUT-2 expression in adult patients with fructose intolerance. *United European Gastroenterology Journal*, 2 (1): 14-21.

Wolfe (M.S), 1992. Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 5 (1): 93-100.

X

Xiao (L.) & Fayer (R), 2011. Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal for Parasitology*, 38 (11): 1239-1255.

Y

Yakoob (J.), Jafri (W.), Abid (S.), Jafri (N.), Hamid (S.), Shah (H.A.), Shaikh (H.), 2005. Giardiasis in patients with dyspeptic symptoms. *World Journal of Gastroenterology*, 11 (42): 6667.

Yang (J.), Deng (Y.), Chu (H.), Cong (Y.), Zhao (J.), Pohl (D.), Misselwitz (B.), Fried (M.), Dai (N.), Fox (M.), 2013. Prevalence and presentation of lactose intolerance and effects on dairy product intake in healthy subjects and patients with Irritable bowel syndrome. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 11: 262-268.

Z

Zhou (P.), Li (E.), Zhu (N.), Robertson (J.), Nash (T.), Singer (S.M.), 2003. Role of interleukin-6 in the control of acute and chronic *Giardia lamblia* infections in mice. *Infection and Immunity*, 71 (3): 1566-1568.

Zugasti (A.), 2009. Intolerancia alimentaria. *Endocrinología y Nutrición*, 56 (5): 241-250.

Zugasti (A.), Estremera (F.), Petrina (E.), 2016. Dieta pobre en FODMPAs (Fermentable oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides and polyols) en síndrome de intestino irritable: Indicación y forma de elaboración. *Endocrinología y Nutrición*, 63 (3): 132-138.

ANEXOS



Anexo I: Consentimiento Informado



MODELO DE CONSENTIMIENTO POR ESCRITO

Título del estudio: Parasitosis intestinales en pacientes con intolerancia a lactosa y/o fructosa . Valoración del efecto de la terapia combinada (farmacológica y nutricional).

Yo, _____ (nombre y apellidos).

He leído la hoja de información que se me ha entregado.
 He podido hacer preguntas sobre el estudio.
 He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con: _____ (nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- 1º Cuando quiera
- 2º Sin tener que dar explicaciones.
- 3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Firma del Participante

Firma del Investigador

Nombre:
 Fecha:

Nombre:
 Fecha:

Anexo II: Cuestionario para la toma de datos del paciente

- **Código**
- **Fecha:**
- **Fecha de nacimiento**
- **Localidad**
- **Profesión**
- **Alergias**
- **Malabsorciones**
- **Inició síntomas gastrointestinales y si cree que hay desencadenante**

- **Valoración de síntomas gastrointestinales actuales:**
- **Inmediatos durante ingesta o posteriores**
- **Distensión abdominal 0-10**
- **Flatulencias 0-10**
- **Saciedad precoz o digestiones pesadas**
- **Tránsito intestinal actual (Color, moco, sangre esteatorrea). Tipo de heces (Escala Bristol)**
- **Perdida de peso y cansancio desde que se levanta.**
- **Dispepsia (Reflujo, acidez, ardor Eructos)**
- **¿Ha sido diagnosticado de *H. Pylori*?**
- **Otras enfermedades (SII/ Enfermedad Celíaca)**
- **Familiares con problemas o enfermedades gastrointestinal**
- **Alteraciones diagnosticadas en las últimas analíticas.**
- **Tratamiento farmacológico crónico/ Complementos /Suplementos usados en las últimas semanas-meses.**
- **Picores o Urticarias**
- **Picor anal**
- **Contacto con heces de otras personas o colectivos de riesgo**
- **Viajes a países tropicales**
- **Mascotas sin desparasitar**
- **Consumidor de comida ecológica sin lavar adecuadamente (fruta y verdura)**
- **Consumidor de agua de fuentes**
- **Contacto con ámbito rural**
- **Antecedentes de par**

Anexo III: “Dieta del día de antes”

NORMAS DIETÉTICAS PREVIAS A LA PRUEBA DE MALABSORCIÓN A LACTOSA, FRUCTOSA O SOBRECRECIMIENTO BACTERIANO

Dieta SIN hidratos de carbono 24 HORAS antes de la prueba

Es importante la restricción de hidratos de carbono, fibra y azúcares simples antes de la realización de la prueba puesto que pueden quedar restos de estos en el intestino grueso y por fermentación aumentar sus niveles de metano o hidrogeno espirados y con ello invalidar la prueba.

SI PUEDE COMER

- Huevos (tortilla francesa, huevo duro...)
- Carne y pescado (salmón, atún, bonito del norte, anchoas) sin acompañantes
- Productos del mar (sepia, calamares, berberechos...)
- Aguacate o aceitunas
- Aceite de oliva
- Requesón o queso de cabra o oveja y yogures naturales
- Leche de cabra, oveja o vaca o bebida vegetal (avena, soja...) únicamente en desayuno.

NO PUEDE COMER

- Pan
- Fruta, verdura y hortalizadas (Alcachofa, puerro, tomate.)
- Fruta deshidratada (Pasas, dátiles, orejones...)
- Legumbres
- Embutidos elaborados tipo (mortadela, jamón york, fuet u otros embutidos similares)
- Frutos secos (Pistachos, nueces, almendras...)
- Refescos
- Arroz y cereales
- Bollería (galletas, dulces, mermeladas, barritas energéticas, miel...)
- Edulcorantes artificiales (Sacarina, Stevia, ciclamato, aspartamo...)

*Se ha de acudir a la prueba en ayunas de 12 horas y sin fumar

*No se ha de haber tomado laxantes ni administrados enemas.

*No se podrá realizar la prueba si se han tomado antibioticos 1 MES antes de la prueba o simbióticos/probióticos/prebióticos, tanto de origen alimentario (Kéfir o chucrut) o en comprimidos/Sobres, 1 SEMANA antes de la prueba.

Anexo IV: Aprobación del estudio por CEIB (IISLAFE) Fase I



DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Don Serafín Rodríguez Capellán, Secretario del Comité Ético de Investigación Biomédica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe,

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado en su sesión de fecha **7 de octubre de 2014**, el Proyecto de Investigación titulado "**PARASITOSIS INTESTINALES EN PACIENTES CON INTOLERANCIA A LACTOSA Y/O FRUCTOSA.**", con nº de registro **2014/0396**.

Que dicho proyecto se ajusta a las normativas éticas sobre investigación biomédica con sujetos humanos y es viable en cuanto al planteamiento científico, objetivos, material y métodos, etc, descritos en la solicitud, así como la Hoja de Información al Paciente y el Consentimiento Informado.

En consecuencia este Comité acuerda emitir **INFORME FAVORABLE** de dicho Proyecto de Investigación que será realizado en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe por el/la **Dr. / Dra. MARIA TRELIS VILLANUEVA** de la **UNIVERSIDAD DE VALENCIA** como Investigador Principal.

Miembros del CEIB:

Presidente:

Dr. JUAN SALOM SANVALERO (Unidad de Circulación Cerebral Experimental)

Vicepresidente:

Dr. JOSE VICENTE CERVERA ZAMORA (Hematología)

Secretario:

D. SERAFIN RODRIGUEZ CAPELLAN (Asesor jurídico)

Miembros:

Dr. SALVADOR ALIÑO PELLICER (Catedrático Farmacólogo Clínico)

Dra. BELEN BELTRAN NICLOS (Medicina Digestiva)

Dra. INMACULADA CALVO PENADES (Reumatología Pediátrica)

Dr. JOSE VICENTE CASTELL RIPOLL (Director de Investigación)

Dra. REMEDIOS CLEMENTE GARCIA ((Medicina Intensiva) (Miembro CBA))

Dra. MARIA JOSE GOMEZ-LECHON MOLINER (Investigadora del Grupo Acreditado en Hepatología Experimental)

Dr. RAMIRO JOVER ATIENZA (Doctor en biología-Universidad de Valencia- Unidad de Bioquímica y Biología Molecular)

Dr. JAVIER PEMAN GARCIA (Investigador del Grupo Acreditado multidisciplinar para el estudio de la Infección Grave)

Dr. ALFREDO PERALES MARIN (Jefe de Servicio - Obstetricia)

Dr. JOSE LUIS PONCE MARCO (Unidad de Cirugía Endocrino Metabólica)

Dr. JOSE LUIS VICENTE SANCHEZ (Jefe de sección-Unidad de Reanimación)

Dra. PILAR SAENZ GONZALEZ (Neonatología)

Dr. MELCHOR HOYOS GARCIA (Gerente del Departamento de salud nº 7-La Fe)

Dra. BEGOÑA POLO MIQUEL (Gastroenterología Pediátrica)

Anexo V: Aprobación del estudio por CEIB (IISLAFE) Fase II



DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Don Serafin Rodríguez Capellán, secretario del Comité Ético de Investigación Biomédica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe,

CERTIFICA

Que este Comité, ha evaluado en su sesión de fecha 7 de abril de 2015, la propuesta del investigador relativa a la modificación:

Nº de modificación: **MODIFICACIÓN DE MARZO 2015**

Motivo de la modificación: Se solicita la ampliación del estudio hasta diciembre de 2016. El estudio sigue el mismo procedimiento ya evaluado y aprobado, sólo se aumenta el nº de pacientes por grupo y se ha pautado la reevaluación de los intolerantes con parásitos en un único momento a los 6 meses.

perteneciente al proyecto de investigación:

Nº de Registro: **2014/0396**

Título: **"PARASITOSIS INTESTINALES EN PACIENTES CON INTOLERANCIA A LACTOSA Y/O FRUCTOSA"**

Que este Comité, emite un **DICTAMEN FAVORABLE** para la realización de la modificación al proyecto, que se esté llevando a cabo en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe por el/la **Dr. / Dra. MARIA TRELIS VILLANUEVA** de la **UNIVERSIDAD DE VALENCIA** como Investigador Principal.

Composición CEIB:

Presidente:

Dr. JUAN SALOM SANVALERO (Unidad de Circulación Cerebral Experimental)

Vicepresidente - Farmacólogo Clínico:

Dr. JOSE VICENTE CERVERA ZAMORA (Hematología)

Secretario- Licenciado en Derecho:

D. SERAFIN RODRIGUEZ CAPELLAN (Asesor jurídico)

Miembros:

Dr. SALVADOR ALIÑO PELLICER (Catedrático Farmacólogo Clínico)

Dra. BELEN BELTRAN NICLOS (Medicina Digestiva)

Dra. INMACULADA CALVO PENADES (Reumatología Pediátrica)

Dr. JOSE VICENTE CASTELL RIPOLL (Director de Investigación)

Dra. REMEDIOS CLEMENTE GARCIA ((Medicina Intensiva) (Miembro CBA))

Dra. MARIA JOSE GOMEZ-LECHON MOLINER (Investigadora del Grupo Acreditado en Hepatología Experimental)

Dr. RAMIRO JOVER ATIENZA (Doctor en biología-Universidad de Valencia- Unidad de Bioquímica y Biología Molecular)

Dr. JAVIER PEGAN GARCIA (Investigador del Grupo Acreditado multidisciplinar para el estudio de la Infección Grave)

Revisión: A

Noviembre 2007

