

TESIS DOCTORAL



FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología y Parasitología

**SIGNIFICANCIA DE LA DIARREA PERSISTENTE
POR PARÁSITOS EN EL SÍNDROME DE DIARREA
CRÓNICA PEDIÁTRICO**

ESPERANZA LEPE BALSALOBRE

Sevilla, 2018



**Dña. CONCEPCIÓN ARIZA ASTOLFI, PROFESORA TITULAR
DE PARASITOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD
DE SEVILLA**

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que lleva por título: *“Significancia de la diarrea persistente por parásitos en el síndrome de diarrea crónica pediátrico”*, presentada por Dña. Esperanza Lepe Balsalobre para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla.

Revisado el texto, doy mi conformidad para su presentación y defensa para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Fdo. Dra. Concepción Ariza Astolfi

DIRECTORA DE LA TESIS

15 de Noviembre de 2018



Dña. CRISTINA ÚBEDA AGUILERA, PROFESORA
ASOCIADA DEL INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS DE
LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE CHILE

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que lleva por título: *“Significancia de la diarrea persistente por parásitos en el síndrome de diarrea crónica pediátrico”*, presentada por Dña. Esperanza Lepe Balsalobre para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla.

Revisado el texto, doy mi conformidad para su presentación y defensa para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Fdo. Dra Cristina Úbeda Aguilera

DIRECTORA DE LA TESIS

15 de Noviembre de 2018

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer la realización de este proyecto a mis directores de tesis, la Dra Concepción Ariza Astolfi, Profesora asociada del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, por su motivación y ánimo constante; y a la Dra Cristina Úbeda Aguilera, Profesora Asociada del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Chile, por todo lo que me ha enseñado y por la confianza que ha depositado en mí.

Al Dr José Manuel Úbeda Ontiveros, Catedrático de Parasitología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, por su inestimable ayuda y orientación durante la realización de este proyecto.

A mi tutor, José Manuel Guerra García, por toda la ayuda y orientación en este proyecto.

Gracias a todo el personal facultativo y técnico del Servicio de Bioquímica del Hospital de Valme. En especial, al Dr Antonio Moro Ortiz y a la Dra María del Mar Vilorio Peñas, dos grandes profesionales y excelentes personas que siempre me han animado en este proyecto y de quienes he aprendido tanto a lo largo de mi formación.

Y, por último, a mi familia y a Javier, por su apoyo y comprensión durante todo este largo camino.

El agradecimiento es la memoria del corazón

Lao-tsé (570-490 a.C.)

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	XII
LISTA DE FIGURAS	XVI
RESUMEN	XIX
I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	3
1. Epidemiología y etiología de la diarrea crónica y/o persistente	4
2. Evaluación y diagnóstico de laboratorio de la diarrea crónica y/o persistente	6
3. Diagnóstico tradicional de laboratorio de la diarrea crónica y/o persistente	7
3.1 Estudios bioquímicos en heces	7
3.2 Estudios microbiológicos en heces	9
3.2.1 Diagnóstico de la diarrea persistente por bacterias y virus	9
3.2.2 Diagnóstico de la diarrea persistente por parásitos	10
4. Diagnóstico no tradicional de laboratorio de la diarrea crónica y/o persistente	11
4.1 Empleo de métodos moleculares	12
4.1.1 PCR <i>in house</i>	12
4.1.2 Plataformas de PCR modulares	13
4.1.3 Plataformas de PCR múltiples	14
4.1.4 Métodos moleculares emergentes	15
4.2 Empleo de cromatografía de gases	15
4.2.1 Importancia de los compuestos volátiles como compuestos clave para diagnóstico de enfermedades	15
4.2.2 Compuestos encontrados para el diagnóstico de enfermedades infecciosas intestinales	16
4.2.3 Biomarcadores para el diagnóstico de giardiasis	18
4.2.4 Determinación de los compuestos volátiles	19
5. Estrategia diagnóstica actual de la infección parasitaria en la diarrea persistente en países desarrollados	21
6. Situación epidemiológica de la parasitosis intestinal en niños en España y Sevilla	22

II. HIPÓTESIS	26
III. OBJETIVOS	28
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	30
1. Diseño, duración y lugar de realización del estudio	30
2. Características y motivo clínico de la población estudiada	31
3. Estudio general de la etiología de causa no infecciosa	38
3.1 Análisis microscópico para la detección de leucocitos fecales	38
3.2 Determinación cuantitativa de calprotectina en heces	39
3.3 Determinación de cuerpos reductores en heces	41
3.4 Estudio de grasas en heces	42
3.5 Estudio de fibras musculares y almidón en heces	43
4. Estudio de la etiología de causa infecciosa	43
4.1 Estudio de bacterias	43
4.2 Estudio de virus	44
4.3 Estudio de parásitos	46
4.3.1 Examen microscópico	46
4.3.2 Tinciones específicas	48
4.3.3 Métodos moleculares	51
4.3.4 Métodos cromatográficos	61
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
1. Estudio de la etiología de causa infecciosa	65
1.1 Estudio de parásitos	65
1.1.1 Resultado del estudio microscópico	65
1.1.2 Comparación de la microscopía con y sin concentración para la detección de parásitos	68
1.1.3 Resultado del estudio molecular	69
1.1.4 Análisis en conjunto de los distintos métodos para el estudio de la etiología parasitaria	71
1.1.5 Comparación de las técnicas microscópicas vs moleculares para la detección de parásitos	74
1.1.6 Estudios complementarios de los resultados discrepantes entre las distintas técnicas de detección de parásitos	77
1.1.7 Características clínicas particulares de las parasitosis detectadas	83
1.2 Estudio de virus y bacterias	96

1.2.1 Resultado del estudio de bacterias	96
1.2.2 Resultado del estudio de virus	98
1.3 Análisis de los resultados obtenidos de etiología de causa infecciosa	98
1.3.1 Análisis de los resultados de bacterias y virus	99
1.3.2. Asociación entre diarrea bacteriana y parásitos	101
1.3.3 Importancia de los parásitos en la diarrea crónica	102
1.3.4 Características de laboratorio y clínicas de los casos	104
1.3.5 Evaluación de las distintas técnicas microscópicas y moleculares para la detección de parásitos	112
1.3.6. Evaluación de las técnicas cromatográficas para la detección de giardiasis	115
2. Estudio de la etiología de causa no infecciosa	125
2.1 Estudio microscópico para la detección de leucocitos fecales	125
2.2 Estudio bioquímico: determinación de cuerpos reductores en heces	128
2.3 Estudio bioquímico: estudio de malabsorción de grasas en heces	129
2.4 Estudio bioquímico: estudio de fibras musculares y almidón en heces	129
2.5 Procesos de malabsorción o maladigestión	130
2.6 Relación entre los procesos de malabsorción y mala digestión con la presencia de parásitos en las heces	132
2.7 Estudio bioquímico: determinación de calprotectina fecal	134
2.8 Comparación de la capacidad de detectar diarrea inflamatoria de los leucocitos fecales y calprotectina	142
3. Análisis en conjunto de los resultados de laboratorio	145
V. PROPUESTA DE ALGORITMO DIAGNÓSTICO	150
VI. CONCLUSIONES	155
VII. REFERENCIAS	160

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1:** Distribución de los niños en función de la edad.
- Tabla 2:** Distribución de las muestras en función del sexo.
- Tabla 3:** Distribución de las muestras en función de la procedencia.
- Tabla 4:** Distribución de las muestras en función del lugar de residencia.
- Tabla 5:** Distribución de las muestras en función del motivo de petición.
- Tabla 6:** Distribución de las muestras en función del motivo de petición y de la edad.
- Tabla 7:** Canales y compensación de color.
- Tabla 8:** Condiciones analíticas de las tres fases de la reacción.
- Tabla 9:** Componentes necesarios para la preparación de la mezcla reacción.
- Tabla 10:** Interpretación de los resultados en función del canal analizado.
- Tabla 11:** Cebadores empleados en la amplificación del gen de la beta giardina.
- Tabla 12:** Condiciones para la amplificación del gen de la beta giardina.
- Tabla 13:** Cebadores empleados en la amplificación del gen RNA ssr.
- Tabla 14:** Condiciones para la amplificación del gen RNA ssr.
- Tabla 15:** Distribución de las muestras en función del resultado del estudio microscópico en fresco.
- Tabla 16:** Distribución de las muestras por resultado de estudio microscópico por concentración.
- Tabla 17:** Distribución de las muestras en función del resultado tras la tinción de Kinyoun.
- Tabla 18:** Distribución de las muestras en función del resultado tras la tinción de Auramina-Rodamina.

Tabla 19: Resultados positivos del estudio de parásitos por técnicas moleculares.

Tabla 20: Relación entre las muestras positivas en el estudio molecular y el ciclo de amplificación.

Tabla 21: Comparativa del rendimiento de los distintos métodos empleados en el estudio de parásitos.

Tabla 22: Resultado del estudio de parásitos en función de las técnicas empleadas.

Tabla 23: Concentración de las muestras estudiadas en la dilución seriada.

Tabla 24: Ciclo de amplificación de las muestras estudiadas en cada dilución realizada.

Tabla 25: Relación entre el motivo de petición y la presencia de parásitos en las muestras.

Tabla 26: Características clínicas de los casos de parasitosis estudiados.

Tabla 27: Datos clínicos de los casos positivos a *Blastocystis* sp detectados.

Tabla 28: Datos clínicos de los casos positivos a *Cryptosporidium* sp detectados.

Tabla 29: Datos clínicos de los casos positivos a *Giardia* sp detectados.

Tabla 30: Distribución de las muestras en función del resultado del coprocultivo.

Tabla 31: Distribución de las muestras en función del resultado del coprocultivo y motivo de petición.

Tabla 32: Distribución de las muestras en función del estudio de virus en heces.

Tabla 33. Determinación de compuestos volátiles en las muestras analizadas por Espacio de cabeza estático de heces de los pacientes con presencia de *Giardia* sp (PG) y paciente sin *Giardia* sp pero con proceso diarreico (PD).

Tabla 34: Distribución de las muestras en función del motivo de la petición y la presencia de leucocitos fecales.

Tabla 35: Distribución de las muestras positivas a parásitos y leucocitos fecales.

Tabla 36: Distribución de las muestras en función del resultado en la prueba de cuerpos reductores en heces.

Tabla 37: Distribución de las muestras en función del resultado del estudio de grasas en heces.

Tabla 38: Distribución de las muestras positivas a parásitos en función de los procesos de malabsorción y maladigestión.

Tabla 39: Análisis general de los resultados de laboratorio obtenidos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Porcentaje de niños con edad menor o igual a 4 años.

Figura 2: Distribución de las muestras con diagnóstico inicial de diarrea persistente en función de la edad.

Figura 3: Distribución de las muestras con diagnóstico inicial de diarrea persistente y dolor abdominal en función de la edad.

Figura 4: Carta de color para determinación de cuerpos reductores en heces.

Figura 5: Vista de los resultados obtenidos en función del canal de color aplicado.

Figura 6: Proceso de amplificación para el gen de la beta giardina y para el gen RNA ssr.

Figura 7: Proceso de extracción de compuestos volátiles del espacio de cabeza estático.

Figura 8: Tinciones de Kinyoun positivas correspondientes a los pacientes n° 12, 279, 1233, 1236.

Figura 9: Tinciones de Auramina positivas correspondientes a los pacientes n° 147, 278, 1232, 1301.

Figura 10: Imágenes microscópicas de los casos discrepantes correspondientes a *Blastocystis* sp.

Figura 11: Imágenes microscópicas de los casos discrepantes correspondientes a *Giardia* sp.

Figura 12: Imágenes por inmunofluorescencia de los casos discrepantes correspondientes a *Giardia* sp.

Figura 13: Electroforesis de los fragmentos amplificados en la PCR in house para estudio de los casos discrepantes de *Giardia* sp.

Figura 14: Cromatogramas pertenecientes a pacientes sin giardiasis (a) y a pacientes con giardiasis (b).

Figura 15. Distribución de las muestras analizadas representadas para CP1 y CP2.

Figura 16. Distribución de los valores y su relación con las muestras.

Figura 17: Valores de calprotectina en el total de la población estudiada.

Figura 18: Valores de calprotectina en el grupo de menores de 1 año.

Figura 19: Valores de calprotectina en el grupo de 1 a 4 años.

Figura 20: Valores de calprotectina en el grupo de 5 a 14 años.

Figura 21: Valores de calprotectina en el grupo de niños con diarrea persistente.

Figura 22: Valores de calprotectina en el grupo de niños con diarrea persistente más dolor abdominal.

Figura 23: Valores de calprotectina en el grupo de niños con diarrea persistente más hematoquecia.

Figura 24: Valores de calprotectina en el grupo de niños con malabsorción de azúcares y/o grasas.

Figura 25: Valores de calprotectina en el grupo de niños con infección bacteriana.

Figura 26: Valores de calprotectina en el grupo de niños con infección parasitaria.

Figura 27: Valores de calprotectina en el grupo de niños con infección por parásitos patógenos.

Figura 28: Valores de calprotectina en el grupo de niños con infección por parásitos no patógenos.

RESUMEN

INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

A la hora de enfocar el estudio de la diarrea persistente en el niño, desde el punto de vista infeccioso, es muy importante la localización y el grado de desarrollo de los países donde residen los pacientes. En general, en los niños pertenecientes a países desarrollados, es probable que la diarrea crónica sea desencadenada por una enfermedad subyacente que causa malabsorción o alteraciones en la digestión. Sin embargo, las infecciones entéricas (particularmente en pacientes inmunodeprimidos) y los factores dietéticos pueden jugar un papel importante en algunos casos. Además, en los países desarrollados, la diarrea funcional representa una alta proporción de diarreas crónicas en los niños. En base a lo anterior, la diarrea crónica de etiología bacteriana (*Salmonella* sp y *Campylobacter* sp) y vírica (Rotavirus, Adenovirus) en estos países es poco frecuente. Respecto a la etiología parasitaria (generalmente por *Giardia lamblia*), hay menos evidencia, aunque existen estudios que consideran que los parásitos rara vez causan diarrea persistente en niños con un sistema inmune intacto.

La importancia de la diarrea persistente de etiología parasitaria en niños en la provincia de Sevilla en la actualidad, es poco conocida y su conocimiento podría ser de gran ayuda para su enfoque diagnóstico.

OBJETIVOS

Determinar la prevalencia de parasitismo intestinal en niños con síndrome de diarrea crónica/persistente en el área sanitaria adscrita al Hospital Universitario de Valme y evaluar la utilidad de técnicas microscópicas, moleculares y cromatográficas en el diagnóstico de la enfermedad parasitaria en el síndrome de diarrea crónica/persistente infantil.

MATERIAL Y METODOS

Estudio de prevalencia de la etiología de la diarrea persistente en general y de la parasitaria en particular en población infantil sintomática, mediante un estudio descriptivo, de corte transversal en el periodo de un año (mayo 2016-mayo 2017).

La metodología utilizada, incluye el estudio de la etiología de causa no infecciosa mediante microscopía, digestión de principios inmediatos y determinación cuantitativa de calprotectina. El estudio de la etiología de causa infecciosa, incluyó la realización de coprocultivo, microscopía con y sin concentración, técnicas moleculares, inmunocromatográficas y cromatográficas.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

El estudio en conjunto de las pruebas de laboratorio mostró que en el 11,3% de los casos de diarrea persistente en niños del Area Sanitaria adscrita la Hospital Universitario de Valme se detectaba un microorganismo infeccioso, en el 11,7% se demostraban procesos de malabsorción o maladigestión y en el 12,2% procesos inflamatorios, aunque en muchas ocasiones, estos procesos no eran hallazgos aislados, sino que estaban interrelacionados.

En concreto, en el 7,1% se detectó la presencia de parásitos, correspondiendo el 2,6% a parásitos considerados clásicamente patógenos (*Giardia* sp y *Cryptosporidium* sp). La etiología bacteriana fue responsable del 3,9% de los casos, siendo *Campylobacter* sp era la etiología bacteriana más prevalente.

Los resultados de este trabajo demuestran que las técnicas moleculares son en general menos sensibles que la microscopía convencional para el diagnóstico de la infección parasitaria en niños con diarrea persistente debido a la baja carga parasitaria y a la presencia de inhibidores en las

muestras. Las técnicas cromatográficas, mostraron una alta sensibilidad a la hora de discriminar casos de pacientes con diarrea por *Giardia* sp de aquellos que presentaban un cuadro diarreico sin etiología parasitaria.

En base a los resultados, el estudio de parásitos en la diarrea persistente en niños, se debería plantear en base a algoritmos de decisión basados en técnicas de detección altamente sensibles.

I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

En niños, los episodios prolongados de diarrea, se caracterizan por un aumento de la frecuencia, la disminución de la consistencia o el incremento de volumen de las deposiciones, que no mejoran y que se prolongan más de dos semanas, definiéndose desde el punto de vista clínico como diarrea crónica y/o persistente (Baran, 2014; Keating, 2005). Los conceptos de "diarrea persistente" y "diarrea crónica" son diferentes. La diarrea persistente es un episodio de diarrea de etiología infecciosa, que se desarrolla de forma aguda, pero que se prolonga por encima de los 14 días (Mathai et al., 2011), mientras que la diarrea crónica se define como la diarrea que dura más de 14 días y no se asocia exclusivamente a causa infecciosa (Lee et al., 2012). Por tanto, la diarrea persistente está incluida en una gran categoría denominada síndrome de diarrea crónica. Las características de las deposiciones y sus síntomas acompañantes son variables según la fisiopatología de la diarrea (osmótica, secretora, esteatorreica), su impacto en el estado nutricional del niño y, en ocasiones, su etiología (Baran, 2014).

En general, una amplia gama de trastornos conduce al síndrome de diarrea crónica o persistente, pudiendo ser el resultado de: (a) procesos inflamatorios o neoplásicos del colon; (b) procesos inflamatorios del intestino delgado; (c) malabsorción; (d) mala digestión debido a insuficiencia pancreática; (e) trastornos de la motilidad intestinal y (f) de causa infecciosa, y puede ser difícil separarlos en base a criterios clínicos exclusivamente (Lee et al., 2012).

En el caso particular de los niños, las causas de diarrea persistente son también diversas, e incluyen causas funcionales e infecciosas, aunque también trastornos

hereditarios de la regulación inmune, digestión de macronutrientes y de la función de barrera de la mucosa o del transporte de nutrientes (Thomas et al., 2003).

1. Epidemiología y etiología de la diarrea crónica y/o persistente

A la hora de enfocar el estudio de la diarrea crónica desde el punto de vista infeccioso (diarrea persistente) es muy importante enfocarlo según la localización y grado de desarrollo de los países donde residen los pacientes. Por ello, las principales causas y la prevalencia de la diarrea crónica en niños, difieren entre los países desarrollados y en desarrollo. En el mundo en desarrollo, la diarrea crónica generalmente se asocia con infecciones entéricas recurrentes y desnutrición y se manifiesta por una enteropatía crónica, con una alteración de la cicatrización de la mucosa y una disminución de la capacidad digestiva y de absorción. En los países desarrollados, los niños tienen menos probabilidades de estar expuestos a infecciones entéricas recurrentes y desnutrición, siendo más probable que la diarrea crónica sea inducida por una enfermedad subyacente que causa malabsorción o mala digestión, pero, sin embargo, las infecciones entéricas (particularmente en pacientes inmunocomprometidos) pueden jugar un papel importante en algunos casos (Keating, 2005).

En los países emergentes (recursos económicos limitados), la etiología de causa infecciosa es responsable de la mayoría de casos de diarrea persistente (Moore, 2017), entre las bacterias: *E. coli* enteroagregativa (también conocida como *E. coli* enteroadherente, CEEA) (Ochoa et al., 2004), *E. coli* enteropatógena (EPEC) en lactantes menores de seis meses, *Shigella* sp, *Salmonella* sp, *Yersinia* sp y *Campylobacter* sp (Ngan et al., 1992; Fagundes-Neto et al., 2000; Ahmed et al., 2001). En el caso de los virus, aunque Rotavirus se relaciona con cuadros diarreicos de corta duración y autolimitados, también se ha relacionado con episodios de

diarrea persistente (Sood et al., 1999). La asociación entre la etiología parasitaria y la diarrea persistente en estos países es menos concluyente, *Cryptosporidium* sp se ha asociado a episodios crónicos de diarrea en Bangladesh pero no en Perú, mientras que *Giardia lamblia* muestra tasas de incidencia similares en la diarrea aguda y crónica (Mondal et al., 2012; Baqui et al., 1992; Lanata et al., 1992; Ramakrishna et al., 2006) en menor medida otros parásitos como *Cyclospora* sp, *Isospora* sp, *Microsporidium* sp, *Entamoeba histolytica* y *Strongyloides* sp también pueden desempeñar algún papel en estos episodios (Ochoa et al., 2004). Sin embargo, los estudios seriados de heces durante los episodios de diarrea crónica sugieren que las infecciones secuenciales con los mismos o diferentes microorganismos son los responsables con mayor frecuencia de diarrea prolongada en estos países (Baqui et al., 1992; Lanata et al., 1992) más que la persistencia de un determinado agente etiológico.

En los países desarrollados, la diarrea crónica de etiología bacteriana (*Salmonella* sp y *Campylobacter* sp) y vírica (Rotavirus, Adenovirus) en estos países es poco frecuente, aunque la enteritis viral prolongada puede ser responsable de algunos episodios (Azim et al., 2004). Sin embargo, hay que tener en cuenta que algunos pacientes en estos países pueden presentar diarrea crónica tras un episodio de diarrea infecciosa que puede ceder de forma espontánea tras unos 2 meses de evolución. En otros pacientes puede aparecer un síndrome de intestino irritable después de una infección gastrointestinal (síndrome de intestino irritable postinfeccioso) y muchos de estos casos, en realidad, corresponden a un estado de sobrecrecimiento bacteriano intestinal. Respecto a la etiología parasitaria (generalmente por *Giardia lamblia*), hay menos evidencia, aunque existen estudios que consideran que los parásitos rara vez causan diarrea persistente en niños con un sistema inmune intacto, siendo más frecuente como causa de diarrea en pacientes inmunodeprimidos (Baran, 2014).

Por tanto, en niños pertenecientes a países desarrollados, es probable que la diarrea crónica sea desencadenada por una enfermedad subyacente que causa malabsorción o alteraciones en la digestión (Guarino et al., 1995). Sin embargo, las infecciones entéricas (particularmente en pacientes inmunodeprimidos) y los factores dietéticos pueden jugar un papel importante en algunos casos (Guiraldes et al., 2013). Además, en los países desarrollados, la diarrea funcional representa una alta proporción de diarreas crónicas en los niños. Esto tiende a ocurrir en niños, por lo demás sanos, con inicio en la infancia tardía o en la edad preescolar, y es autolimitada una vez que se reduce o elimina de la dieta carbohidratos osmóticamente activos, y/o se adecua el contenido en grasa. Por otro lado, la enfermedad celíaca también es una causa relativamente común de diarrea crónica no infecciosa en estos niños y puede presentarse con una amplia variedad de sintomatología y gravedad (Garnier-Lengliné et al., 2015). Por último, otras circunstancias no infecciosas pueden provocar diarrea crónica y/o persistente e incluyen la enfermedad inflamatoria intestinal, colitis isquémica, colitis microscópica y otras formas de enfermedad idiopática (DuPont, 2016).

La diferencia en la fisiopatología subyacente a la mayoría de los casos de diarrea crónica en los países en desarrollo, en comparación con los países desarrollados, requiere diferentes enfoques para el diagnóstico y el tratamiento en los dos entornos, no pudiéndose unificar el enfoque del estudio de laboratorio sin tener en cuenta estas circunstancias.

2. Evaluación y diagnóstico de laboratorio de la diarrea crónica y/o persistente

La selección de la estrategia adecuada para diagnosticar la causa de la diarrea crónica en el niño depende de la presentación clínica en el paciente. En la mayoría

de los casos, una historia completa y un examen físico limitan el rango de posibilidades. La edad de presentación y el entorno de la población (lugar y condiciones socioculturales) también son factores importantes a tener en cuenta. Además, se debe preguntar a los padres sobre los síntomas y las posibles exposiciones (leche cruda, agua no tratada).

Lo que sí parece claro, es que el estudio de laboratorio de la diarrea crónica o persistente en el niño requiere un abordaje integral. Por ello, la Asociación Americana de Microbiología en su *Clinical Microbiology Procedures Handbook* (García et al., 2010) incluye los estudios microbiológicos y bioquímicos necesarios para un diagnóstico completo del síndrome.

Es muy importante remarcar, que la evaluación de los niños con diarrea persistente de etiología desconocida debe iniciarse después de que éstos presenten sintomatología durante más de 14 días.

3. Diagnóstico tradicional de laboratorio de la diarrea crónica y/o persistente

3.1 Estudios bioquímicos en heces

Si la sospecha de diarrea crónica y/o persistente es clara, se debe obtener al menos una muestra de sangre y de heces para estudio de laboratorio.

Respecto a los estudios serológicos, el despistaje de la enfermedad celíaca es muy importante en esta primera evaluación e incluiría el estudio en suero de anticuerpos antigliadina IgA, antiendomiso IgA y antitransglutaminasa IgA (preferentemente cuantificada para detectar aquellos falsos negativos debido a

déficit congénito de IgA) (Polanco-Allué et al., 2010) el estudio en heces de los niveles de calprotectina fecal que aumentan en la inflamación intestinal y a menudo son útiles para distinguir las causas inflamatorias de las no inflamatorias de la diarrea crónica. Sin embargo, las características de la prueba varían según la prevalencia de la enfermedad inflamatoria intestinal en la población de estudio. Por lo tanto, la prueba puede usarse para enfocar la siguiente etapa de la investigación, pero los resultados no deben interpretarse para incluir o excluir firmemente cualquier categoría de enfermedad (Vaos et al., 2013).

El estudio bioquímico inicial de las heces debe incluir:

1. Determinación del pH, electrolitos y sustancias reductoras para heces acuosas. El "gap" osmótico de las heces se puede usar para estimar las contribuciones relativas de los electrolitos y no electrolitos a la retención de agua en la luz intestinal. En la diarrea osmótica, los no electrolitos causan retención de agua (Baran, 2014). La detección de sustancias reductoras (tabletas Clinitest), de estar presentes sugieren intolerancia a monosacáridos del tipo glucosa, polímeros de glucosa o maltodextrinas; o intolerancia a disacáridos del tipo lactosa (Velasco-Benitez, 2004).
2. Sangre oculta, leucocitos fecales. La determinación de sangre oculta (métodos inmunoquímicos) y leucocitos fecales (microscopía) tienen cierta capacidad para predecir procesos inflamatorios. Sin embargo, la sensibilidad y especificidad de cada una de estas pruebas es baja (Tibble et al., 2002).
3. Grasas en heces: existen una amplia variedad de pruebas para detectar malabsorción de grasas (esteatorrea). El estándar de oro para el diagnóstico de la esteatorrea es la estimación cuantitativa de la grasa de las heces, generalmente realizada durante 72 horas. Debido a que la recolección de las heces durante 72 horas es engorrosa, las pruebas cualitativas también se usan para detectar la esteatorrea. Estas incluyen la tinción Sudán III y un método

gravimétrico rápido. La sensibilidad y fiabilidad de la prueba de Sudán III está limitada por la variabilidad en su rendimiento e interpretación (Khouri et al., 1989).

3.2 Estudios microbiológicos en heces

3.2.1 Diagnóstico de la diarrea persistente por bacterias y virus

En escasas ocasiones se aísla *Campylobacter* sp, *Salmonella* sp o se detectan virus entéricos como origen de una diarrea persistente en niños de países desarrollados (JKellermayer et al., 2017) aun así, el estudio bacteriológico de las heces mediante cultivo (el llamado coprocultivo) forma parte de la mayoría de los protocolos de estudio inicial de la diarrea persistente (Ramos et al., 2010) y es la técnica de referencia (Álvarez et al., 2017). En general, en el coprocultivo se utilizan distintos medios diferenciales y selectivos. Para el caso de *Salmonella* sp, se utilizan medios poco selectivos como el agar MacConkey o medios con selectividad moderada como el agar *Salmonella-Shigella*. La utilización de medios líquidos de enriquecimiento como el caldo de selenito es muy importante ya que en los casos de diarrea persistente suele encontrarse una baja concentración de salmonelas en las heces. En el caso de *Campylobacter* sp también se emplean medios selectivos como el medio de Butzler o Skirrow que incorporan antibióticos para inhibir el crecimiento de la flora intestinal, además se deben incubar en atmósfera microaerófila y 42°C.

Aunque la contribución de los virus al síndrome de diarrea persistente es poco importante (enteritis viral prolongada), el estudio de virus entéricos (Rotavirus y Adenovirus principalmente) también tiende a incorporarse rutinariamente en la valoración inicial del paciente (Schiller, 2004). El diagnóstico rutinario se basa en métodos directos, consistentes generalmente en la detección de las partículas víricas o sus antígenos mediante anticuerpos monoclonales (Álvarez et al., 2017).

En la actualidad se dispone de métodos de inmunocromatografía, técnicas de enzimoimmunoanálisis (EIA) convencional, técnicas de EIA de membrana y técnicas de aglutinación de partículas de látex.

La incorporación del diagnóstico molecular en forma de paneles moleculares múltiples, también conocidos como paneles sindrómicos, en el estudio de la diarrea crónica es más controvertido y aunque importante para el estudio de la diarrea aguda (Khare et al., 2014), es menos rentable en la crónica por la baja carga bacteriana de las muestras (Pankhurst et al., 2014). En términos de sensibilidad, se ha demostrado que la PCR aumenta la detección de muchos microorganismos respecto al coprocultivo con la excepción de *Salmonella* sp (Cunningham et al., 2010), donde el enriquecimiento en caldo selenito aporta una mejor sensibilidad al coprocultivo.

3.2.2 Diagnóstico de la diarrea persistente por parásitos

El examen microscópico sigue siendo el método tradicional para el estudio de parásitos de heces (García, 2009), tanto el examen en fresco, como las técnicas de concentración (sedimentación o flotación). Además, los trofozoítos de protozoos no se visualizarán tras los estudios de concentración ya que el procedimiento suele destruirlos y por ese motivo es imprescindible el examen en fresco como fase inicial del estudio microscópico. Además, el diagnóstico microscópico de los coccidios (*Cryptosporidium* sp) requiere la utilización de tinciones específicas, generalmente una modificación de la tinción de Ziehl-Neelsen, denominada tinción de *Kinyoun*.

Sin embargo, la sensibilidad de las técnicas microscópicas, parece no adecuada para el estudio de los protozoos más prevalentes en los casos de diarrea persistente, en algunos estudios se comunican valores de 54,8% y 66,4% para *Cryptosporidium* sp y *Giardia* sp respectivamente (McHardy et al., 2014). A lo anterior hay que unir otros factores que influyen en la sensibilidad de la microscopía tales como la

excreción esporádica (que requiere el examen de múltiples muestras de heces), la administración previa de antiparasitarios, el intervalo de recolección de las muestras y la conservación de las heces.

La detección microscópica mediante tinción con anticuerpos fluorescentes aumenta significativamente la sensibilidad y la especificidad en la detección de protozoos entéricos (Manser et al., 2014). La detección de *Giardia* sp por inmunofluorescencia directa muestra una sensibilidad que oscila entre 99-100% y una especificidad del 100% respecto a las técnicas convencionales (66% de la microscopía convencional y 93% tinción tricrómica convencional) (García et al., 1992). Para *Cryptosporidium* sp, los resultados son también adecuados con sensibilidades que oscilan entre el 93-100% para la inmunofluorescencia respecto al 54,8-92% de la tinción ácido-resistente modificada (Alles et al., 1995). En el caso de *Blastocystis* sp la técnica muestra una sensibilidad que oscila entre 73-87% (tinción tricrómica 50%) y una especificidad del 97,3% (tinción tricrómica 50%) (Dogruman et al., 2010; Marhoumy et al., 2015).

Para obviar el uso de la microscopía, se han desarrollado pruebas rápidas de detección de antígenos de *Giardia* sp y *Cryptosporidium* sp mediante inmunocromatografía o enzimoimmunoensayo (ELISA). Estas pruebas muestran sensibilidades entre el 63-83% y especificidades del 97-100% para *Giardia* sp y del 47-100% y 46-100% para *Cryptosporidium* sp (Agnamey et al., 2011). A la vista de la amplia variabilidad de las especificidades y particularmente las sensibilidades de estas pruebas el US Council of State and Territorial Epidemiologists excluye los casos diagnosticados como *Cryptosporidium* sp mediante inmunocromatografía y los considera probables en lugar de confirmados.

4. Diagnóstico no tradicional de laboratorio de la diarrea crónica y/o persistente

4.1 Empleo de métodos moleculares

Como resultado de las limitaciones de los ensayos microscópicos e inmunológicos, se han desarrollado métodos de detección basados en pruebas moleculares. Este enfoque presenta numerosas ventajas sobre los métodos tradicionales, en principio una mayor sensibilidad y especificidad, capacidad de utilizar distintas dianas moleculares en un ensayo múltiple, la posibilidad de cuantificación y tipado molecular, y un tiempo de respuesta rápido, particularmente cuando la PCR está acoplada a un sistema automatizado de extracción de ADN (Verweij et al., 2014).

Se sabe que la inhibición de la PCR por parte de los componentes fecales es un problema grave (Monteiro et al., 1997). Los inhibidores son polisacáridos complejos que posiblemente se originan a partir del contenido vegetal de la dieta.

Además, los métodos moleculares en el caso de la detección directa desde las heces y su rendimiento se afectan mucho si las muestras han sido conservadas en SAF o PVA, además son particularmente sensibles a la calidad y pureza del ADN de partida, por lo que la elección de un método de extracción eficiente es un paso crítico, ya que se han observado diferencias de rendimiento entre diferentes equipos de extracción (Paulos et al., 2016).

El abordaje del diagnóstico molecular de la diarrea de etiología parasitaria, principalmente de los protozoos, ha experimentado distintos enfoques en los últimos años, desde los métodos de PCR *in house* a la introducción de las plataformas sindrómicas.

4.1.1 PCR *in house*

En general, se han desarrollado múltiples protocolos moleculares *in house* para la detección de protozoos en heces en casos de diarrea. En general, estas técnicas no se han estandarizado y han sido dirigidas en su mayoría, a estudios de investigación más que al diagnóstico clínico de rutina. Además, son técnicas que no

permiten el procesado de un gran número de muestras al ser métodos muy manuales.

En la actualidad el diagnóstico está basado en el empleo de PCR en tiempo real con sondas TaqMan o SYBR Green empleando cebadores que amplifican secuencias de la subunidad pequeña del ARN ribósomico 18S.

Los estudios publicados, no evalúan la sensibilidad de estas técnicas, aunque en general se comparan a la microscopía convencional y concluyen que son más sensibles. La especificidad si ha sido evaluada demostrando que la PCR multiplex en tiempo real para la detección de *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum* muestra una especificidad del 100% (Verweij et al., 2003).

4.1.2 Plataformas de PCR modulares

Estas plataformas, son la evolución comercial de los protocolos moleculares *in house*. Sólo existe en el mercado una plataforma disponible el Lightmix® Parasitical Kit (Roche/TIB Molbiol). La plataforma LightMix Modular contienen cebadores premezclados con sondas de hidrólisis y controles positivos obviando los problemas de estandarización de los protocolos *in house*.

El sistema modular LightMix permite trabajar en formato multiplex, con 6 fluoróforos, incluyendo un control interno de amplificación, y detectar los parásitos en el LC-480® de Roche. Las sondas son independientes, lo cual permite crear combinaciones de hasta 5 parásitos por muestra (*Entamoeba histolytica*, *Giardia* sp, *Dientamoeba* sp, *Cryptosporidium* sp y *Blastocystis* sp), debido a que los perfiles térmicos de amplificación son comunes y comparten el mismo reactivo de amplificación. La plataforma ha demostrado una sensibilidad del 100% para todos los protozoos, y especificidades del 93,2% para *B. hominis*, 98% para *G. intestinalis*, 99,8% para especies de *Cryptosporidium* sp, 84% para *D. fragilis* y 100% para *E. histolytica* (Byrne et al, 2015).

4.1.3 Plataformas de PCR múltiples

En la actualidad, la mayoría de los distintos equipos aprobados por la FDA o con marcado CE, están basados en pruebas de PCR mediante plataformas múltiples. La mayoría permiten la detección e identificación simultánea de los protozoos intestinales más comunes (así como de bacterias y/o virus) y podrían ser utilizados en el diagnóstico del síndrome de diarrea persistente. Las plataformas disponibles en la actualidad son: el BD MAX™ Enteric Parasite Panel (EPP) (Becton, Dickinson and Company, EE. UU.), el panel gastrointestinal Luminex xTAG1 (Luminex Corporation, Toronto, Canadá), el Biofire FilmArray™ Panel gastrointestinal (BioFire Diagnostics, Salt Lake City, UT), Verigene Enteric Pathogens (EP) (Luminex) y el EasyScreen™ Enteric Parasite Detection Kit (Genetic Signatures, Sydney, Australia). Todos emplean sistemas automatizados de extracción y permiten el estudio simultáneo de distintas muestras.

La sensibilidad y especificidad de estas plataformas varía según los equipos. El BD MAX™ Enteric Parasite Panel muestra una sensibilidad y especificidad del 98,2% y 99,5% para *G. duodenalis* y del 95,5% y 99,6% para *Cryptosporidium* sp, respectivamente (Madison-Antenucci, 2016). En el caso del Luminex xTAG, la sensibilidad y especificidad es del 95–100% y 99–100% para *G. duodenalis* y del 95–100% y 100% para *Cryptosporidium* sp, respectivamente (Perry, M. et al., 2014). Para el Biofire FilmArray, la sensibilidad y especificidad publicada oscila entre el 100% y 99,5–100% para *G. duodenalis* y del 95–100% y 99,6–100% para *Cryptosporidium* sp respectivamente (Huang et al., 2016). Por último, el Verigene Enteric Pathogens (EP) test (Luminex) muestra una sensibilidad del 92% para *G. duodenalis*, 100% para *Cryptosporidium* sp y 96% para *Blastocystis* sp (Stark et al., 2014).

La gran ventaja de estas plataformas es la gran automatización de los estudios, sin embargo, al ser paneles cerrados, es obligatorio el estudio simultáneo de virus,

bacterias y parásitos; lo que, unido a su alto coste económico, impide un adecuado planteamiento de los estudios en términos de eficiencia diagnóstica.

4.1.4 Métodos moleculares emergentes

Una desventaja de los métodos moleculares anteriores es que solo pueden detectar los parásitos previamente definidos en los equipos. Una estrategia alternativa aprovecha la creciente disponibilidad de plataformas de secuenciación masiva (next-generation sequencing, NGS) (Lecuit et al., 2014). En la actualidad, la metagenómica shotgun, es capaz de perfilar toda la diversidad microbiana o patobioma (microbioma patógeno), incluidas bacterias, protozoos, helmintos y virus, simultáneamente, y podría ser de mucha utilidad en el síndrome de diarrea persistente (Schneeberger et al., 2016). Estas técnicas requieren la disponibilidad de genomas de referencia parciales o completos y como en la actualidad se han secuenciado muchos genomas de parásitos entéricos, incluyendo *Cryptosporidium* sp, *Giardia* sp y *Blastocystis* sp, esto facilitará la incorporación al diagnóstico del síndrome de diarrea crónica de las plataformas de secuenciación masiva.

4.2 Empleo de cromatografía de gases

4.2.1 Importancia de los compuestos volátiles como compuestos clave para diagnóstico de enfermedades

En la actualidad, las metodologías empleadas para el diagnóstico de enfermedades se han diversificado en gran medida. La búsqueda de biomarcadores específicos de enfermedades es una tendencia en varias áreas de investigación. En concreto, los compuestos orgánicos volátiles (COV) determinados por métodos cromatográficos se han evaluado como compuestos clave para el diagnóstico de una gran variedad de enfermedades (Shirasu et al, 2011).

Las alteraciones en los perfiles de los COV en las muestras estudiadas (heces, orina, sudor, aliento) son un reflejo de los procesos metabólicos fisiológicos y fisiopatológicos que pueden ocurrir en el organismo. Este hecho explica que el olfato se haya utilizado durante mucho tiempo para detectar enfermedades; así, los médicos tradicionales chinos observaron distintos olores en la orina de pacientes diabéticos y a finales del siglo XIX, Robert Koch identificó olores distintivos en heridas infectadas por microorganismos (Chan et al, 2016).

Debido a esto, hay estudios muy novedosos sobre la asociación entre distintas enfermedades (Alzheimer, Parkinson, cáncer) y los COV, en concreto, un estudio demuestra diferencias significativas en aire exhalado de pacientes con cáncer de mama y controles sanos (Changsong et al, 2014).

Estos métodos de diagnóstico para la detección de compuestos orgánicos volátiles son método-dependientes ya que abarcan distintas técnicas cromatográficas, como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (Buijck et al, 2016) hasta métodos electrónicos como *eNose* (Wojnowski et al, 2017) que son menos discriminatorios de la etiología infecciosa, pero, en general, permiten un abordaje integral de los procesos de diarrea persistente. Además, el límite de detección de los métodos cromatográficos permite la determinación de compuestos volátiles que se encuentran presentes en diversas matrices en concentraciones muy pequeñas.

Es por esto que, los métodos cromatográficos permiten un abordaje muy distinto e interesante del síndrome de la diarrea crónica al de los estudios expuestos en apartados anteriores. Estos métodos no se centran en un solo microorganismo, sino en el estudio de biomarcadores lo que permite un abordaje integral en el estudio de la muestra.

4.2.2 Compuestos encontrados para el diagnóstico de enfermedades infecciosas intestinales

La determinación de compuestos volátiles como biomarcadores de enfermedades infecciosas ha sido estudiado previamente por otros autores.

En concreto, el estudio del perfil de compuestos orgánicos volátiles aplicado al diagnóstico de la diarrea infecciosa, no está extensamente desarrollado y el limitado número de estudios impiden establecer un perfil uniforme para las distintas etiologías. En base a lo anterior, los estudios disponibles buscan más establecer patrones de compuestos en comparación con controles sanos.

En el caso de la diarrea por *Clostridium difficile*, los estudios publicados demuestran que las muestras fecales positivas podrían distinguirse de los controles en función de sus perfiles de compuestos orgánicos volátiles. Así, Tait et al. (2014) demuestran un perfil de aumento de 2-fluoro-4-metilfenol y ácido isocaproico; Garner et al. (2009) demuestra un perfil de disminución de 2-etanol; tolueno, 6-metil-3,5-heptadieno-2-ona y ácido hexanoico; y, por último, Probert et al. (2004) constata un perfil único de aumento de 5-metil-2-furancarboxialdehído.

En el caso de la diarrea por *Campylobacter jejuni*; Garner et al. (2009) demuestran un perfil de aumento de 1-butoxi-2-propanol y ausencia de 3-metil furano y dimetilsulfido; Probert et al. (2004) demuestran un perfil con ausencia de terpenos e hidrocarburos. Mientras que en la diarrea por *Vibrio cholerae*, Garner et al. (2009) constata un perfil con aumento de dimetil disulfido y pmenth-1-en-8-ol.

Por otro lado, estas técnicas también se han empleado en el abordaje del estudio de la etiología vírica de la diarrea, aunque los trabajos se han centrado exclusivamente en el diagnóstico de la diarrea por rotavirus donde (Al-Kateb et al, 2012) se demuestra un perfil de aumento de aldehídos y 2-3-butanediona y en otro estudio (Probert et al, 2004) se constata un perfil único con aumento de dodecanoato de etilo de etilo.

Por último, el abordaje del estudio de la etiología parasitaria de la diarrea está menos desarrollado y sólo existe un trabajo que aborda el diagnóstico de la diarrea

por *Giardia* sp donde Bond et al. (2015) demuestran un patrón complejo con aumento de 2-metilfenol y 4-metilfenol y disminución de acetona y 2-butanona.

4.2.3 Biomarcadores para el diagnóstico de giardiasis

Aunque la mayoría de los estudios sobre perfiles de compuestos orgánicos volátiles aplicados al diagnóstico de la diarrea infecciosa muestran resultados prometedores, los resultados obtenidos rara vez se reproducen en otros estudios. Este hecho da como resultado una gran variedad de compuestos volátiles que se consideran específicos de enfermedad diarreica infecciosa.

Actualmente, la variación entre los protocolos de trabajo y el muestreo impide la comparación entre los distintos estudios. Por lo tanto, antes de que los perfiles de compuestos orgánicos volátiles puedan cumplir con su potencial de biomarcadores clínicos, los protocolos relacionados con las condiciones de muestreo (muestreo, transporte y almacenamiento) y las técnicas analíticas deben ser estandarizadas.

En general, la presencia de metil-fenoles (cresoles) en los casos de diarrea, puede convertirlos en un marcador muy interesante (Bond et al., 2015). El p-cresol es uno de los metabolitos del aminoácido tirosina y, en cierta medida, también de la fenilalanina, que se convierte en ácido 4-hidroxifenilacético por las bacterias intestinales, antes de ser descarboxilado al p-cresol (putrefacción). Las principales bacterias contribuyentes son los aerobios (principalmente enterobacterias), pero, en cierta medida, también los anaerobios (principalmente *Clostridium perfringens*) y parásitos (caso de *Giardia* sp).

Además, en este único estudio sobre los COV en pacientes con giardiasis se identificaron 24 compuestos con diferencias significativas entre el grupo control y el grupo con *Giardia* sp. En concreto, los 5 COV más significativos fueron: 2,2,4,4-tetrametiloctano, 1-propanol, ácido acético, 2,2,4,6,6-pentametilheptano y acetona.

4.2.4 Determinación de los compuestos volátiles

Según la técnica de análisis empleada y el tipo de matriz que se analiza, la determinación de los compuestos volátiles puede requerir una fase previa de extracción.

Cuando para el análisis es necesario extraer los compuestos volátiles de la matriz pueden aplicarse diversas técnicas. Las más utilizadas son:

a) Extracción en espacio de cabeza estático (*Static Headspace Extraction, HS*): Este método se basa en el siguiente principio: las moléculas volátiles del producto migran al espacio de cabeza o fase gaseosa que está sobre él hasta alcanzar el equilibrio. De esta manera, esta técnica permite a los analistas tomar una alícuota de la fase gaseosa, la cual está en equilibrio con una fase sólida o líquida (Ettre, 2002), que es representativa del aroma de la muestra. El principal factor limitante de esta técnica es su limitada sensibilidad, por ello es utilizada principalmente para el análisis de compuestos mayoritarios. Es por esto que es una técnica es muy representativa del aroma real de la muestra.

b) Extracción en espacio de cabeza dinámico (*Dynamic Headspace Extraction, DHS*): A diferencia del HS, se aplica una corriente de gas que fuerza el paso de los compuestos volátiles al espacio de cabeza. Los volátiles arrastrados al espacio de cabeza son retenidos en algún material acumulándose para su posterior análisis (B'Hymer, 2003). Los materiales más utilizados son: Tenax®, Chromosorb®, Porapak®, o resinas XAD Amberlite®. Este sistema tiene más capacidad de extracción que el anterior y por tanto más sensibilidad.

c) Extracción líquido-líquido (*Liquid-Liquid Extraction, LLE*): En este tipo de extracción se pone en contacto un solvente orgánico con la muestra líquida. Para la extracción de compuestos volátiles se utilizan indistintamente embudos de decantación (Cobb y Bursey, 1978), extractores en continuo (Gutiérrez et al., 1990), así como técnicas con ultrasonidos (Mecozzi, 2002). Esta técnica extrae gran

cantidad de compuestos aromáticos, sin embargo, el principal problema reside en el arrastre de compuestos que no son de interés y que dificultan el análisis objetivo de la muestra. Además, requiere del uso de disolventes orgánicos contaminantes ambientales.

d) Destilación y extracción simultáneas: No requiere paso de concentración del extracto y permite extraer los mismos compuestos que la extracción líquido-líquido. Sin embargo, debido al calentamiento de la muestra con las altas temperaturas puede dar lugar a la aparición de compuestos indeseables.

e) Extracción en fase sólida (*Solid Phase Extraction, SPE*): El principio en el que se basa esta técnica es la diferente afinidad de los analitos entre una fase sólida, que es el adsorbente, y una líquida, que es la muestra. Así, se hace pasar la muestra sobre una fase sólida que los adsorbe de manera específica. Se diferencian básicamente tres tipos de adsorbentes: sílices enlazadas, carbón y poliméricos. La elución de los analitos se realiza con unos pocos mililitros de un solvente orgánico como por ejemplo metanol, diclorometano o acetato de etilo.

f) Microextracción en fase sólida (*Solid Phase Microextraction, SPME*): Fue desarrollada por Arthur y Pawliszyn (1990). Se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta de un adsorbente o absorbente, en la mayoría de los casos polimérico, seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura o disolvente orgánico. La fibra se encuentra ensamblada en un portafibra, cuya estructura es similar a una jeringa ligeramente modificada. La muestra se puede tomar del espacio de cabeza o mediante inmersión en ella. Es simple, muy sensible y reproducible, requiere un bajo coste y pequeños volúmenes de muestra. Se puede utilizar con muestras sólidas, líquidas o gaseosas.

g) Extracción por absorción con barras magnéticas agitadoras (*Stir Bar Sorptive Extraction, SBSE*): Esta técnica fue desarrollada por Baltussen y Sandra

(Baltussen et al., 1999; Baltussen et al., 2002) y se basa en los mismos principios de extracción que la SPME. El absorbente está unido a una barra magnética agitadora. El más usado es el comercialmente conocido como Twister®. Consiste en una barra magnética agitadora recubierta de vidrio y ésta a su vez por una capa de polidimetilsiloxano (PDMS). En este caso los analitos pueden ser extraídos introduciéndolos directamente en la muestra (inmersión) o bien en el espacio de cabeza de la misma.

5. Estrategia diagnóstica actual de la infección parasitaria en la diarrea persistente en países desarrollados

La estrategia diagnóstica de la infección parasitaria en países desarrollados, ha estado muy influenciada en los últimos años por la baja prevalencia y diversidad de las especies de protozoos que causan diarrea persistente. En base a lo anterior, muchos laboratorios han reemplazado los métodos de diagnóstico basados en la microscopía, por métodos de enzimoimmunoensayo (ELISA) más sensibles y específicos (y menos dependientes del observador) y en la mayoría de los laboratorios de EE. UU. *Giardia* sp, *Cryptosporidium* sp y *E. histolytica* se diagnostican mediante pruebas de ELISA comerciales, sobre todo en centros con alta carga de trabajo (DuPont, 2016). En centros con baja carga de trabajo o muy especializados se utilizan pruebas de inmunofluorescencia directa debido a su alta sensibilidad (García, 1997.). La mayor sensibilidad y especificidad de la PCR en tiempo real para la detección de parásitos, probablemente favorecerá su uso, ya que en muchos países la experiencia en microscopía está disminuyendo, además, el tiempo de trabajo se reduce enormemente y hace innecesario obtener las tres muestras fecales clásicas para el examen parasitológico. Obviamente, obtener una

muestra en lugar de tres es más conveniente y eficiente para los niños, sus padres y el laboratorio. Este enfoque sería similar al ya más instaurado para la detección de microorganismos causantes de diarrea bacteriana y viral (coprocultivo molecular) que ya se utiliza en un número creciente de laboratorios y otorga una dimensión completamente nueva al diagnóstico diferencial de laboratorio de las enfermedades diarreicas (Boer et al., 2010). Aunque ya existen iniciativas para organizar esquemas de evaluación de la calidad para el diagnóstico molecular de parásitos intestinales, estos sistemas aún no han sido ampliamente adoptados, posiblemente debido al alto costo en comparación con la microscopía tradicional y a la incertidumbre en cuanto a la importancia clínica de la detección molecular de cada uno de los parásitos incluidos en los paneles. Por tanto, su impacto en la práctica clínica aún está por valorar (Verweij, 2014).

6. Situación epidemiológica de la parasitosis intestinal en niños en España y Sevilla

En base a lo anterior, la importancia de la diarrea persistente de etiología parasitaria en nuestro medio en la actualidad es poco conocida. Lo que sí parece claro es que la prevalencia de parásitos en el síndrome de diarrea persistente en niños debe estar íntimamente relacionado con la prevalencia de parásitos en la población general.

Sin embargo, la incidencia de la parasitosis por protozoos ha ido cambiando en nuestro medio en los últimos 30 años.

En España, en los años 80 del siglo XX, varios estudios demostraban una prevalencia de *Giardia* sp de alrededor del 7-8% en niños asintomáticos (Vassallo et al., 1982). Aunque en poblaciones pediátricas con condiciones deficitarias de higiene la prevalencia se situaba en alrededor del 20% (Valle Navarro et al., 1980).

En los años 90, la prevalencia de protozoos experimentó una disminución respecto a los datos anteriores. Así en un estudio en un grupo de población pediátrica de centros educativos en la Bahía de Cádiz, la prevalencia de *Giardia lamblia* se situó en un 2,7% y la de *Cryptosporidium* sp en un 2.3% (García et al., 1989). En otro estudio, en niños asintomáticos de zonas rurales de Ávila, la prevalencia de *Giardia* sp se situó en un 4,4% (Pedraza et al., 1994).

A partir del año 2000 no existen estudios publicados hasta 2010 donde en un estudio de prevalencia, que incluía una muestra de alumnos asistentes a centros de educación infantil y primaria, en Valencia y que incluía niños la población general e inmigrantes comunicaba una prevalencia de *Blastocystis hominis* del 14,9%, *Giardia lamblia* del 6,1%, *Entamoeba coli* 1,7%, *Endolimax nana* del 1,5%, *Entamoeba hartmanni* 1%, *Entamoeba histolytica* 0,6%, *Dientamoeba fragilis* 0,2% y *Iodamoeba bütschlii* 0,2% (Chover et al., 2010).

En concreto en la población de la provincia de Sevilla (área objeto de nuestro trabajo), en un estudio publicado en 1997, que incluía una muestra de niños entre 6 y 10 años de la población general (sin manifestaciones clínicas), las especies de protozoos encontradas correspondían a *Giardia lamblia* (5,05%), *Entamoeba coli* (2,45%), *Endolimax nana* (1,61%), *Entamoeba histolytica* (0,31%), *Entamoeba hartmanni* (0,05%), *Iodamoeba bütschlii* (0,05%) (Perez et al., 1997). No existen otros estudios en la población de Sevilla hasta el publicado por Coronel-Rodríguez et al. (2017), un análisis descriptivo, transversal y retrospectivo de los estudios de parásitos fecales realizados a niños y solicitados por Centros de Atención Primaria durante el período 2010-2014 al Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen del Rocío, de Sevilla. Este estudio encuentra un resultado patológico en un 9,3% de las muestras, siendo *Giardia lamblia* el parásito más frecuente, seguido de *Blastocystis* sp. En menores de un año fueron patológicas el 3,7% de las muestras y solo se visualizaron dos tipos de parásitos (*Cryptosporidium* sp y *Giardia lamblia*). En el grupo de edad de 10-14 años fueron positivas un 9,9%

del total de muestras remitidas si bien se hallaron hasta 12 tipos de parásitos, el más frecuentemente encontrado ha fue *Blastocystis* sp. seguido de *Giardia lamblia*, *Endolimax nana* y *Entamoeba coli*.

Es interesante remarcar, que con excepción del estudio de Chover-Lara et al. (2010) en Valencia, en nuestro país en los diferentes estudios coproparasitológicos realizados en los últimos 50 años no existe referencia a *Dientamoeba fragilis*, excepción hecha de Cataluña. Concretamente, un estudio realizado en 1978-79 en pacientes que acuden al Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y otro estudio realizado en guarderías en 1981-82 detectan frecuencias del 7,8% y del 12,3%, respectivamente, apareciendo *D. fragilis* como la segunda especie más prevalente después de *Giardia lamblia*. Asimismo, en el segundo de estos estudios se destaca la mayor incidencia de *D. fragilis* frente a los demás protozoos intestinales detectados en aquellos casos con positividad a la oxiuriasis (Gomila et al., 2003).

II. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

Las mejoras en las condiciones sociosanitarias en España y más concretamente en Sevilla, deben haber afectado a la prevalencia de la enfermedad parasitaria intestinal en niños, por lo que la importancia de la etiología parasitaria en el síndrome de diarrea persistente pediátrico debe haber disminuido.

Las heces de pacientes con procesos diarreicos por giardiasis presentan compuestos volátiles característicos que son producto de la presencia del parásito, los cuáles permiten distinguir entre un paciente con diarrea por *Giardia* sp y un proceso diarreico por otras causas, pudiendo ser éstos biomarcadores para esta infección.

II. OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

Objetivo principal

Determinar la prevalencia de parasitismo intestinal en niños con síndrome de diarrea crónica/persistente en el área sanitaria adscrita al Hospital Universitario de Valme.

Objetivos secundarios

Determinar las características clínicas de los niños con diarrea persistente de etiología parasitaria.

Determinar la prevalencia de otras etiologías en el síndrome de diarrea crónica/persistente infantil.

Evaluar la utilidad de las técnicas moleculares en el diagnóstico de la enfermedad parasitaria en el síndrome de diarrea crónica/persistente infantil.

Evaluar la utilidad de las técnicas cromatográficas en el diagnóstico de la enfermedad parasitaria en el síndrome de diarrea crónica/persistente infantil.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño, duración y lugar de realización del estudio

Estudio de prevalencia de la etiología de la diarrea persistente en general y de la parasitaria en particular en población infantil sintomática, mediante un estudio descriptivo, de corte transversal en el periodo de un año (mayo 2016-mayo 2017). El ámbito territorial se circunscribió al área sanitaria adscrita al Hospital Universitario de Valme.

La diarrea crónica se definió como la diarrea que dura más de 14 días y no se asocia exclusivamente a causa infecciosa.

Cálculo del tamaño de muestra

Los cálculos para obtener el tamaño de la muestra y la selección de la misma se han realizado mediante el software Raosoft sample size calculator, accesible via web (<http://www.raosoft.com/samplesize.html>) para un tamaño de muestra de 3.412 niños, con un margen de error del 3%, un nivel de confianza del 95% y una variabilidad del 50%; en base a las fórmulas: $x = Z(c/100)^2 r(100-r)$ $n = N x / ((N-1)E^2 + x)$ $E = \text{Sqrt}[(N - n)x/n(N-1)]$ Donde n es el tamaño de muestra, E el margen de error, N es el tamaño de la población, r es la variabilidad positiva, y Z (c/100) es el valor crítico para el nivel de confianza c. Este cálculo se basa en la distribución normal.

Software empleado

Los datos se obtuvieron del software del hospital y fueron incluidos en una base de datos construida en Excel Office de Microsoft 2016.

Consideraciones éticas

La aprobación ética para el estudio se obtuvo del Comité Ético del Hospital Universitario de Valme.

2. Características y motivo clínico de la población estudiada

El estudio incluyó a niños entre 1 mes y 14 años de edad. La población diana fue de 3.412 niños, aproximadamente el 9% de la población infantil del área (37.110 niños), que acudía a consulta de Atención Primaria o Atención Especializada por diarrea crónica y/o dolor abdominal en dicho periodo y que remitían una muestra de heces para estudio al Laboratorio Clínico del Hospital Universitario de Valme. La recolección de las muestras se realizó de forma proporcional a la distribución de edad de los niños que consultaban y se estratificó por estacionalidad: primavera, verano, otoño e invierno.

Se incluyeron un total de 777 niños en el estudio, la mediana de edad fue de 6 años con un rango de edad entre 2 meses a 14 años (tabla 1), el porcentaje de niños con una edad menor o igual a 4 años incluidos fue del 42% (328/777) (figura 1). Respecto al sexo de los niños incluidos: 406 (52%) eran niños y 371 (48%) niñas (tabla 2). Respecto a su procedencia 761 (98%) procedían de atención primaria y 16 (2%) de atención especializada (tabla 3), en la tabla 4 se especifican el número de niños según su lugar de residencia.

Edad (años)	Número pacientes
0,2	3
0,3	2
0,4	1
0,5	4
0,6	6
0,7	4
0,8	1
0,9	4
1	103
2	103
3	40
4	57
5	52
6	59
7	41
8	53
9	64
10	71
11	34
12	39
13	22
14	14
Total	777

Tabla 1. Distribución de los niños en función de la edad.

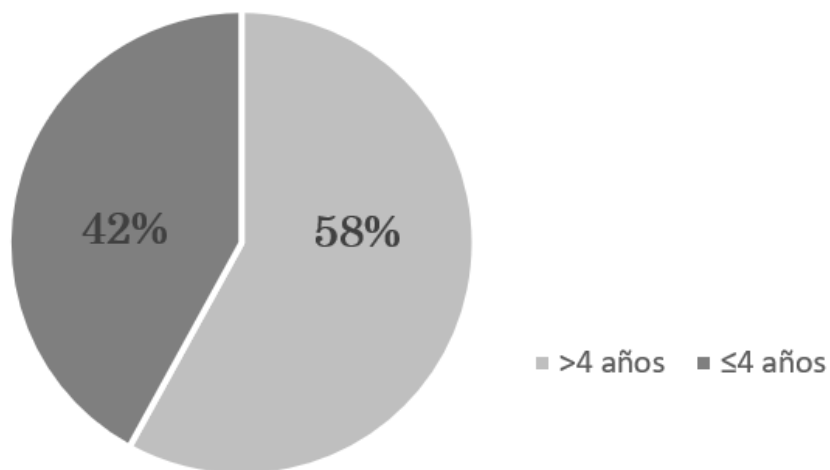


Figura 1. Porcentaje de niños con edad menor o igual a 4 años.

Sexo	Número de pacientes	Porcentaje
Niños	406	52%
Niñas	371	48%
Total	777	100%

Tabla 2. Distribución de las muestras en función del sexo.

Procedencia	Número de pacientes	Porcentaje
Atención especializada	16	2%
Atención primaria	761	98%
Total	777	100%

Tabla 3. Distribución de las muestras en función de la procedencia.

Lugar de residencia	Número de pacientes	Porcentaje
Alcalá de Guadaira	108	13,9%
Arahal	91	11,7%
Bellavista	3	0,4%
Coripe	1	0,1%
Dos Hermanas	101	13,0%
El cuervo	1	0,1%
El Rancho	5	0,6%
El Viso del Alcor	52	6,7%
Las Cabezas de San Juan	87	11,2%
Lebrija	65	8,4%
Los Montecillos	6	0,8%
Los Palacios	77	9,9%
Mairena del Alcor	36	4,6%
Montecillos	2	0,3%
Montellano	35	4,5%
Morón	83	10,7%
Oliva	6	0,8%
Paradas	18	2,3%
Total	777	100%

Tabla 4. Distribución de las muestras en función del lugar de residencia.

El motivo clínico de petición de los estudios de laboratorio se especifica en la tabla 5, siendo los principales: cuadros de diarrea persistente con dolor abdominal con el 50,2% (390/777) y diarrea persistente con el 46,7% (363/777) de los casos. Las edades de los niños que presentaban los cuadros más prevalentes se detallan en la tabla 6.

La mediana de edad de los niños cuyo motivo de petición fue diarrea persistente fue de 5 años (rango: 0,2-14 años), de ellos el 47% (169/363) correspondían a niños de <=4 años (figura 2).

La mediana de edad de los niños cuyo motivo de petición fue diarrea persistente más dolor abdominal fue de 5 años (rango: 0,2-14 años), de ellos el 37% (143/390) correspondían a niños de <=4 años (figura 3).

Motivo de petición	Número de pacientes	Porcentaje
Diarrea persistente	361	46,5%
Diarrea persistente y dolor abdominal	391	50,3%
Diarrea persistente y fiebre	1	0,1%
Diarrea persistente y hematoquecia	14	1,8%
Diarrea persistente y pérdida de peso	3	0,4%
Diarrea persistente y vómitos	4	0,5%
Diarrea persistente, dolor abdominal y vómitos	1	0,1%
Diarrea persistente, vómitos y fiebre	1	0,1%
Dolor abdominal y dolor ocular	1	0,1%
Total	777	100%

Tabla 5. Distribución de las muestras en función del motivo de petición.

Motivo de petición	Edad	Número de pacientes	Porcentaje
Diarrea persistente	0,2	1	0,1%
	0,3	2	0,3%
	0,5	3	0,4%
	0,6	2	0,3%
	0,7	3	0,4%
	0,8	1	0,1%
	0,9	2	0,3%
	1	57	7,3%
	2	53	6,8%
	3	18	2,3%
	4	25	3,2%
	5	20	2,6%
	6	31	4,0%
	7	13	1,7%
	8	23	3,0%
	9	34	4,4%
	10	38	4,9%
	11	8	1,0%
	12	13	1,7%
	13	9	1,2%
14	5	0,6%	
Diarrea persistente y dolor abdominal	0,2	2	0,3%
	0,4	1	0,1%
	0,5	1	0,1%
	0,6	4	0,5%
	0,7	1	0,1%
	0,9	2	0,3%
	1	38	4,9%
	2	48	6,2%
	3	20	2,6%
	4	31	4,0%
	5	30	3,9%
	6	27	3,5%

	7	23	3,0%
	8	30	3,9%
	9	29	3,7%
	10	32	4,1%
	11	26	3,3%
	12	25	3,2%
	13	12	1,5%
	14	9	1,2%
Diarrea persistente y hematoquecia	1	2	0,3%
	2	1	0,1%
	4	1	0,1%
	5	2	0,3%
	6	1	0,1%
	7	5	0,6%
	12	1	0,1%
	13	1	0,1%

Tabla 6. Distribución de las muestras en función del motivo de petición y de la edad.

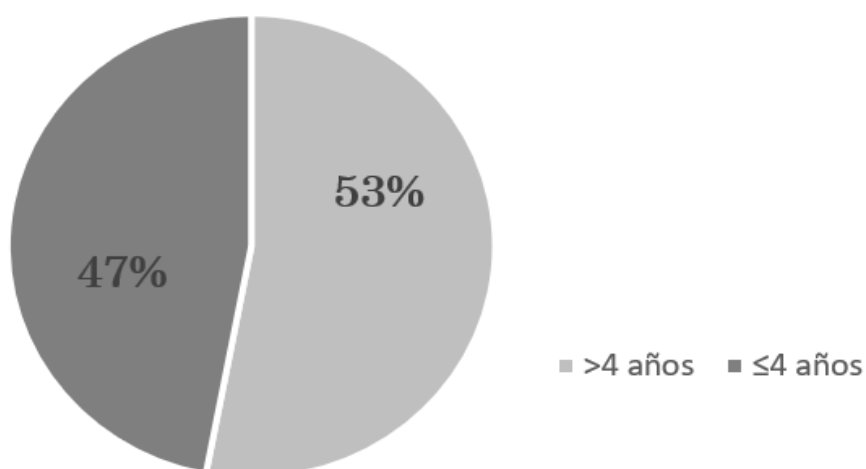


Figura 2. Distribución de las muestras con diagnóstico inicial de diarrea persistente en función de la edad.

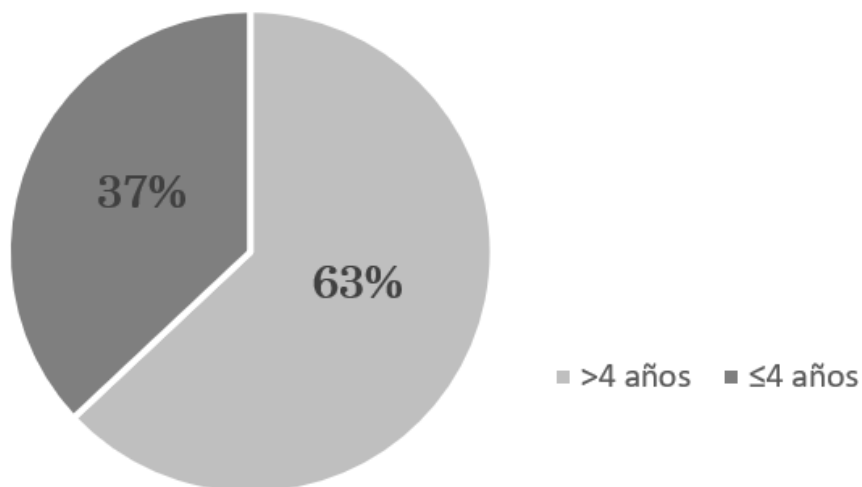


Figura 3. Distribución de las muestras con diagnóstico inicial de diarrea persistente y dolor abdominal en función de la edad.

3. Estudio general de la etiología de causa no infecciosa

3.1 Análisis microscópico para la detección de leucocitos fecales

Método: observación microscópica (x40) tras tinción con azul de metileno (Merck) de las heces, solo se contaron los neutrófilos con núcleos segmentados inequívocos.

Interpretación: los resultados de las pruebas se calificaron sobre la base del número de neutrófilos por campo (x40) de la siguiente manera: "abundantes" >10 neutrófilos, "moderado" indicaron de 5 a 10 neutrófilos, "escasos" <5 neutrófilos y negativo" 0 neutrófilos.

3.2 Determinación cuantitativa de calprotectina en heces

Método: fuoro-enzimoinmunoensayo en un analizador Phadia 100 (EliA Calprotectin Thermo Fisher Scientific).

Técnica: previamente al inmunoanálisis se realizó en primer lugar una extracción de la muestra de heces, siguiendo el siguiente protocolo de Inmundiagnostics:

1. Disolver 15 mg de las heces en 1,5 mL de solución de buffer y agitar hasta conseguir una suspensión homogénea.
2. Dejar reposar durante unos 10 minutos aproximadamente para que sedimente todo el contenido.
3. El sobrenadante resultante se diluye 1:25 en solución de buffer (Por ejemplo, para 40 μ l de sobrenadante se añadirá 960 μ l de solución de buffer).
4. Añadir los calibradores, controles y las muestras diluidas a cada pocillo correspondiente en la placa.
5. Cubrir la placa e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

6. Desechar el contenido de cada pocillo y lavar 5 veces con 250 μl de solución de lavado. Después del último lavado, eliminar el tampón de lavado residual golpeando firmemente la placa sobre el papel absorbente.
7. Agregar 100 μl de conjugado en cada pocillo.
8. Cubrir la placa e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
9. Desechar el contenido de cada pocillo y lavar 5 veces con 250 μl de solución de lavado. Después del último lavado, eliminar el tampón de lavado residual golpeando firmemente la placa sobre el papel absorbente.
10. Agregar 100 μl de sustrato en cada pocillo y mezclar bien.
11. Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
12. Agregar 100 μl de solución de parada en cada pocillo y mezclar bien.
13. Medir la absorción inmediatamente con un lector de ELISA a 450 nm contra 620 nm como referencia.

Interpretación de los resultados:

Para el cálculo de los resultados se aplica el “algoritmo de 4 parámetros” que consiste en utilizar una ordenada lineal para la densidad óptica y una función logarítmica en el eje de abscisa para la concentración.

Nota: cuando se aplica una abscisa logarítmica, el cero del estándar debe especificarse con un valor inferior a 1.

Los extractos de heces se conservaron durante un máximo de tres meses a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Los resultados fueron interpretados en base a los criterios de Diamantti et al.

3.3 Determinación de cuerpos reductores en heces

Método: AimTab Reducing Substances Tablets (Germain Laboratories).

Técnica: añadir 1 volumen de muestras por cada 2 volúmenes de agua desionizada.

1. Homogenización de la muestra con ayuda de pipeta Pasteur.
2. Usando una pipeta Pasteur, transferir 15 gotas de esta suspensión en un nuevo tubo.
3. Añadir una pastilla de reactivo AimTab Reducing Substances Tablets (Germain Laboratories).
4. Esperar 15 segundos que ocurra la reacción exotérmica y comparar el color producido con la carta de color del protocolo de la técnica.

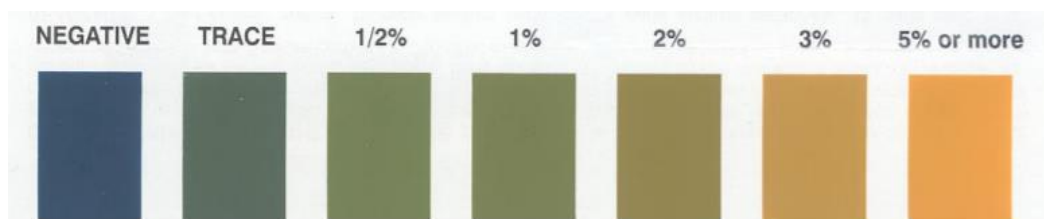


Figura 4. Carta de color para determinación de cuerpos reductores en heces.

En caso de que exista lactosa en las heces, el grupo carbonilo funcional libre de ésta reacciona con el Cu^{2+} del reactivo ocurriendo la reacción de Benedict-Fehling (reacción de reducción).

Interpretación de los resultados:

Resultado negativo: color azul.

Resultado positivo: trazas (0,25%), 1+ (0,5%), 2+ (0.75%), 3+ (1%), o 4+ (valor superior o igual a 2%).

3.4 Estudio de grasas en heces

Método: tinción de las heces con Sudan III

Técnica: mezclar una pequeña cantidad de heces con una cantidad igual de etanol 95% en un tubo.

1. Añadir dos gotas de Sudan III en la mezcla anterior. Mezclar bien y esperar unos minutos.
2. Usando una pipeta, depositar una gota en un portaobjetos y observar al microscopio las gotas de grasas (grasa neutra) y cristales aciculares (ácidos grasos).
3. Añadir 4 gotas de ácido acético glacial en el tubo que contiene la muestra. Mezclar con la ayuda de una pipeta y depositar una gota en un portaobjetos.
4. Calentar suavemente el portaobjetos sobre una llama.
5. Observar de nuevo al microscopio 40X las gotas de color rojo.

Interpretación de los resultados:

<100 gotas antes o después de calentar: se informa como grasa no incrementada.

>100 gotas antes o después de calentar: se informa como grasa incrementada.

Si existen cristales aciculares de ácidos grasos antes de calentar y gotas de grasa después de calentar: se informará como ácidos grasos incrementados.

3.5 Estudio de fibras musculares y almidón en heces

Método: tinción con Lugol (Panreac) de las heces.

Técnica: diluir una pequeña cantidad de heces en 3 mL de suero fisiológico.

1. Homogenizar la muestra con ayuda de pipeta Pasteur.
2. Depositar una gota de la dilución en un portaobjetos y añadirle una gota de Lugol.
3. Esperar unos minutos a que se tiña la muestra y observar al microscopio con objetivo de x40.

Interpretación de los resultados:

Los gránulos de almidón se colorean de azul oscuro.

Fibras musculares se observan como cilindros cortos atravesados de estrías.

4. Estudio de la etiología de causa infecciosa

4.1 Estudio de bacterias

Método: coprocultivo.

Técnica:

Preparar una emulsión de 1-2 g de heces en solución salina fisiológica, a partir de la cual se inoculan los medios de cultivo.

Inocular con asa de 10 µL, placas de agar sangre, agar MacConkey, agar *Salmonella-Shigella* y agar Campy-BAP.

Incubar a 37°C durante 48 horas en estufa de aire las placas de agar sangre, agar MacConkey, agar *Salmonella-Shigella* y a 42°C en campana con sobre de microaerofilia la placa de agar Campy-BAP.

Identificar las colonias lactosa negativa del agar MacConkey o las colonias del agar *Salmonella-Shigella* con centro negro mediante galería de identificación BBL Enterotube II (BBL) y aglutinación mediante M-IDENT® *Campylobacter* (Microkit).

4.2 Estudio de virus

Método: el estudio de Rotavirus y Adenovirus se realizó por inmunocromatografía ROTA-ADENOVIRUS combo cassette (Cromatest-Linear Chemicals).

Preparación de la muestra

1. Desenroscar la cubierta y con ayuda del aplicador se toma una muestra de las heces. Para ello se pasa el aplicador por la muestra recogiendo una pequeña cantidad de heces, si la muestra fuera líquida se tomarán 100 µL de la misma con una pipeta, introducir la muestra en el tubo para dilución.
2. Cerrar el tubo que contiene la muestra y el diluyente. Agitar para facilitar la dispersión de la muestra.

Técnica

1. Previamente el dispositivo, las muestras de heces y los controles se deben acondicionar a la temperatura ambiente (15-30°C).
2. Agitar el tubo de dilución de la muestra para asegurar una buena dispersión. Cortar la punta del tapón.
3. Sacar el dispositivo de reacción Rota-Adeno virus de su envase para utilizarlo inmediatamente.
4. Tomar 5 gotas o 150 µL del líquido y depositarlas en la ventana circular marcada con una flecha o una S en el dispositivo.
5. Leer el resultado a los 10 minutos (deben de aparecer líneas coloreadas).

Interpretación de resultados:

NEGATIVO: Una sola línea de color VERDE aparece en la ventana central del dispositivo de reacción, en la zona marcada con la letra C (línea de control).

ROTAVIRUS POSITIVO: Además de la línea de control VERDE, también aparece una línea ROJA (línea de resultado de Rotavirus) en la zona marcada con la letra T (zona de resultado).

ADENOVIRUS POSITIVO: Además de la línea de control VERDE, también aparece una línea AZUL (línea de resultado de Adenovirus) en la zona marcada con la letra T (zona de resultado).

ROTAVIRUS-ADENOVIRUS POSITIVO: Todas las líneas anteriores aparecen al mismo tiempo durante la prueba debido a una infección simultánea de Rotavirus y Adenovirus. Se vería una línea VERDE en la zona de control y una línea ROJA y una AZUL en la zona de resultados.

INVÁLIDO: Cuando la línea de control (VERDE) no aparece independientemente de que aparezca o no la/s línea/s de resultado (ROJA/AZUL).

4.3 Estudio de parásitos

Una vez recibidas las muestras, éstas se dividieron en dos partes:

1. Una parte sin conservar, que se destinará al estudio microscópico directo y técnicas cromatográficas.
2. Otra parte conservada en formol-acetato (SAF) para técnicas de concentración, tinciones y técnicas moleculares.

4.3.1 Examen microscópico

A. Examen microscópico directo sin concentración

Procedimiento:

1. Depositar una gota de solución salina (NaCl al 0,85%) en el lado izquierdo del portaobjetos y una gota de lugol (solución de trabajo 1:5 en agua destilada) en el lado derecho del portaobjetos.
2. Tomar una pequeña cantidad de muestra fecal y emulsionar completamente las heces en solución salina y lugol usando un aplicador. La muestra debe extenderse lo suficiente para lograr una preparación fina (suficientemente delgada como para que pueda leerse un texto a través de ella).
3. Colocar un cubreobjetos de 22 mm en ángulo en el borde de la preparación emulsionada y dejar caer con suavidad.

4. Visualizar sistemáticamente toda la extensión mediante campos superpuestos con el objetivo 10x.
5. Cambiar a objetivo 40X para el estudio más detallado de cualquier estructura protozoaria sospechosa.

B. Examen microscópico tras concentración (formol-eter)

Procedimiento:

1. Homogenizar la muestra hasta conseguir que se resuspenda uniformemente y se mezcle bien con el fijador.
2. Homogenizar aproximadamente 1 g de la muestra de heces en 10 mL de solución de formalina al 10%, en un tubo de vidrio de 15 mL.
3. Después de 5 minutos, filtrar la suspensión, a través de una gasa doble instalada en un embudo, a otro tubo de 15 mL.
4. Agregar 3 mL de éter sulfúrico, tapar el tubo y mezclar fuertemente durante 30 segundos.
5. Centrifugar a 2000 rpm durante dos minutos, retirar las capas superiores que contienen éter y los restos de alimentos de la materia fecal.
6. Tomar una pequeña cantidad del sedimento y emulsionar completamente las heces en solución salina y lugol usando un aplicador. La muestra debe extenderse lo suficiente para lograr una preparación fina (suficientemente delgada como para que pueda leerse un texto a través de ella).
7. Colocar un cubreobjetos de 22 mm en ángulo en el borde de la preparación emulsionada y dejar caer con suavidad.

8. Visualizar sistemáticamente toda la extensión mediante campos superpuestos con el objetivo 10x.
9. Cambiar a objetivo 40X para un estudio más detallado de cualquier estructura protozoaria sospechosa.

4.3.2 Tinciones específicas

A. Coloración de Kinyoun modificada para *Cryptosporidium* sp

Procedimiento:

1. Fijar el frotis (a partir del sedimento obtenido tras la concentración formol-éter) en metanol absoluto durante cinco minutos.
2. Cubrir la preparación con carboxifucsina y teñir durante 5 minutos.
3. Lavar con agua.
4. Decolorar con alcohol – ácido durante un minuto.
5. Lavar con agua
6. Cubrir la preparación con azul de metileno al 1% y teñir durante 1 minuto.
7. Lavar con agua y dejar secar.
8. Montar en glicerina para microscopía.
9. Cuando el montaje está seco, examinar primero el frotis de control antes de proceder a las muestras del paciente.

10. Examinar microscópicamente mediante objetivos x40 y x100 mediante campos superpuestos. Los ooquistes de *Cryptosporidium* sp se teñirán de rosa a rojo sobre un fondo verde-azulado.
- 11.

B. Tinción de Auramina-Rodamina para *Cryptosporidium* sp

Procedimiento:

1. Fijar el frotis (a partir del sedimento obtenido tras la concentración formol-éter) en metanol absoluto durante cinco minutos.
2. Cubrir la extensión con una solución de auramina y teñir durante 10 minutos
3. Lavar con agua.
4. Decolorar con alcohol-ácido durante 4 minutos.
5. Lavar con agua.
6. Cubrir con solución de rojo de tiazina durante 3 minutos.
7. Lavar con agua
8. Cuando el montaje está seco, examinar primero el frotis de control antes de proceder a las muestras del paciente.
9. Examinar con microscopio de fluorescencia con objetivo x40 mediante campos superpuestos. Los ooquistes de *Cryptosporidium* sp se teñirán de rosa a rojo sobre un fondo verde-azulado.
10. Los ooquistes presentarán fluorescencia verde brillante sobre fondo negro y el resto de elementos se colorearán de rojo.

C. Tinción de Field

Equipo comercial: Modified Field's Stain Kit. Hardy Diagnostics. Colorantes:
Solución A: Fosfato de Sodio: 2,6 g, Fosfato de potasio: 2,6 g, Azul de metileno,
certificado: 1,6 g, Azure I (Azure B): 1,0 g. Solución B: Eosina: 2,0 g.

Procedimiento:

1. Fijar la preparación con 5 a 10 gotas de solución B y agregar inmediatamente 5 a 10 gotas de solución A.
2. Dejar teñir durante aproximadamente 20 segundos.
3. Enjuagar suavemente con agua del grifo.
4. Una vez que la preparación se haya lavado, inclinar suavemente el portaobjetos para permitir que se escurra el exceso de agua.
5. Secar al aire a temperatura ambiente.
6. Examinar las preparaciones 1000X, usando el objetivo de inmersión en aceite. Los protozoos y su citoplasma deben teñirse de azul violáceo; el nucléolo y flagelos deben teñirse de azul oscuro y púrpura rojizo oscuro, respectivamente.

D. Tinción de anticuerpos fluorescentes frente *Giardia* sp

Procedimiento:

1. Diluir la muestra 1/10 en tampón PBS, agitar bien.

Preparación de los portaobjetos:

1. Depositar 20 microL de la muestra diluida en un portaobjeto de fluorescencia con pocillos marcados.

2. Dejar secar al aire
3. Fijar durante 5 minutos con acetona y dejar secar al aire.
4. Añadir 25 microL de RG1 (anticuerpos monoclonales) a la muestra fijada de forma que cubra el área del pocillo.
5. Incubar los portaobjetos a 37°C en una cámara húmeda durante 30 minutos.
6. Lavar en PBS durante 1 minuto.
7. Escurrir el líquido del portaobjetos y limpiar los bordes de los pocillos con papel absorbente.
8. Añadir una gota de medio de montaje y colocar un cubreobjeto encima.
9. Visualizar en microscopio de fluorescencia 200X y 400X
10. Las muestras positivas se visualizarán como formas elípticas de 8-12 microm con fluorescencia verde brillante.

4.3.3 Métodos moleculares

El estudio molecular se realizó para la búsqueda de los parásitos más prevalentes en el síndrome de diarrea crónica en países desarrollados en base a la bibliografía (Thomas PD et al, 2003): *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Blastocystis hominis* y *Dientamoeba fragilis*.

Preparación y extracción de la muestra:

1. Preparación de la muestra:

-Añadir 50 µL de heces en SAF a 500 µL de S.T.A.R Buffer (Ref. 03335208001) en un tubo de 2 mL.

-Vortex 1 min.

-Pulso de centrifuga de 5 segundos (no sedimentar).

-Proceder al pretratamiento con 200 µL de muestra.

-Pretratamiento con MagNA Pure Bacteria Lysis Buffer (04659180001).

-Añadir 200 µL de sobrenadante en un tubo de 2 ml.

-Añadir 180 µL de MagNA Pure Bacteria Lysis Buffer (Roche), 20 µL de Proteinasa K (Sigma-Aldrich), y 5 µL del control positivo de Light Mix Modular PhHV, el cual se utiliza como control de extracción.

-Incubación en termobloque (con agitación) de 10 minutos a 65°C, seguida de 10 min a 95°C.

-Hacer un pulso de centrifuga de 5 segundos.

2. Extracción:

-Colocar las muestras en el MagNA Pure Compact (Roche), previamente programado para la extracción de ADN de bacterias (Protocolo MP96).

-Utilizar un volumen de muestra de 400 µL y un volumen de elución de 5 µL.

Amplificación molecular:

Equipo comercial: LightMix® Modular Gastro Parasite Multiplex Testing (Roche TIB MOLBIOL).

- Componentes del LightMix® Modular Kit

Referencia: 50-0612-96, *Giardia*, channel 530.

Referencia: 53-0613-96, *Dientamoeba*, channel 580.

Referencia: 58-0614-96, *Cryptosporidium*, channel 610.

Referencia: 61-0600-96, *Blastocystis*, channel 640.

Referencia: 66-0901-96, PhHV Extraction Control, Roche RNA Process Control, channel 660.

Referencia: 90-0600-01, Gastro Pos Control.

- Instrumentos y reactivos adicionales

Cat.-No. 07 339 585 001, LightCycler® Multiplex DNA Master.

Cat.-No. 05 015 278 001, LightCycler® 480 II Instrument.

Cat.-No. 05 200 881 001, Cobas z 480 Analyzer, UDF software 1.5.

Cat.-No. 04 729 692 001, LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 white.

Cat.-No. 06 296 971 001, Color Compensation Kit Hexaplex 40-0320-00.

- Canales y compensación de color

Abrir Tools; Seleccionar el formato de detección; highlight 4 Colour Hydrolysis probes, copiar. Definir los filtros para los canales de emisión y excitación de 530, 580, 610, 640 y 660 nm.

Establecer el formato de detección: Seleccionar Quant Factor (por defecto 1) and Max Integration Time (segundos) en base a la tabla siguiente.

	500	530	580	610	640	660
Quant Factor	10	10	10	10	10	5
Max Integration time	1 sec	1 sec	1 sec	2 sec	3 sec	3 sec
LightCycler® 480	450-500	483-533	523-568	523-610	523-640	615-670
LightCycler® 480 II	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	618-660
cobas z 480	n.a.	465-510	540-580	540-610	540-645	610-670

Tabla 7. Canales y compensación de color.

Renombrar como “ModularDx Hexaplex” cerrar y salvar los cambios.

- Programación del equipo Roche 480

Emplear la versión de software 1.5 y programar las tres fases de la reacción; desnaturalización, ciclos de amplificación y enfriamiento en base a la tabla siguiente.

Program Step:	RT Step*	Denaturation	Cycling			Cooling
Parameter						
Analysis Mode	None	None	Quantification mode			None
Cycles	1	1	45			1
Target [°C]	55	95	95	60	72	40
Hold [hh:mm:ss]	00:05:00	00:05:00	00:00:05	00:00:15	00:00:15	00:00:30
Ramp Rate [°C/s] 96	4.4	4.4	4.4	2.2	4.4	1.5
Ramp Rate [°C/s] 384	4.6	4.6	4.6	2.4	4.6	2.0
Acquisition Mode	None	None	None	Single	None	None

Tabla 8. Condiciones analíticas de las tres fases de la reacción.

- Protocolo experimental

Muestras: Usar ‘High Pure PCR Template Preparation Kit’.

Controles positivos: emplear el control suministrado en cada ModularDx kit para cada parásito.

Controles negativos: emplear agua grado PCR como control negativo.

- Preparación del reactivo

Añadir 50 microL de agua grado PCR a cada vial de reactivo, mezclar en vortex y dar un pulso de centrifuga.

- Preparación del control positivo

Añadir 160 microL de agua grado PCR al vial que tiene tapadera negra, mezclar con pipeta 10 veces (no emplear vortex ya que se pueden generar aerosoles).

- Preparación de la mezcla de reacción

La preparación se realiza en base a lo especificado en la tabla siguiente.

One reaction	Tetraplex Reaction Multiplex DNA Master	100 reactions
8.9 µl	Water , PCR-grade (colorless cap, provided with the Roche Master kit)	890 µl
0.5 µl	Reagent mix (parameter specific reagents containing primers and probes)	50 µl
0.5 µl	Control Reaction or additional assay (Multiplex PCR)	50 µl
0.5 µl	Second target	50 µl
0.5 µl	Third target	50 µl
4.0 µl	Roche Master (see Roche manual)	400 µl
0.1 µl	RT Enzyme if run in multiplex with RNA targets	10 µl
14.9 µl	Volume of Reaction Mix	1.490 µl

Tabla 9. Componentes necesarios para la preparación de la mezcla reacción.

Incluir siempre un control positivo y al menos un control negativo (NTC). En un tubo refrigerado, preparar la mezcla de reacción multiplicando los volúmenes de reacción individuales (columna izquierda) por el número de reacciones, incluidos los controles más una reserva. El volumen de pipeteo más pequeño permitido es 1 µl; preparar un mínimo de al menos 10 reacciones.

- Lectura de resultados

Realizar el análisis de datos usando el método de "Second Derivative Maximum method" (Automated (F" max). El número de ciclo para el "Crossing Point (CP)" de cada muestra se calcula automáticamente.

Abrir un análisis para cada canal de color, activar la compensación de color para cada uno y guardar.

Realizar una vista previa de los resultados: los controles positivos deben ser positivos, los controles negativos deben ser negativos, comprobar que la separación de canales está funcionando (funcionalidad de la compensación del color). El control de reacción debe ser visible en la mayoría de los pocillos (se permite que falle para las muestras altamente positivas).

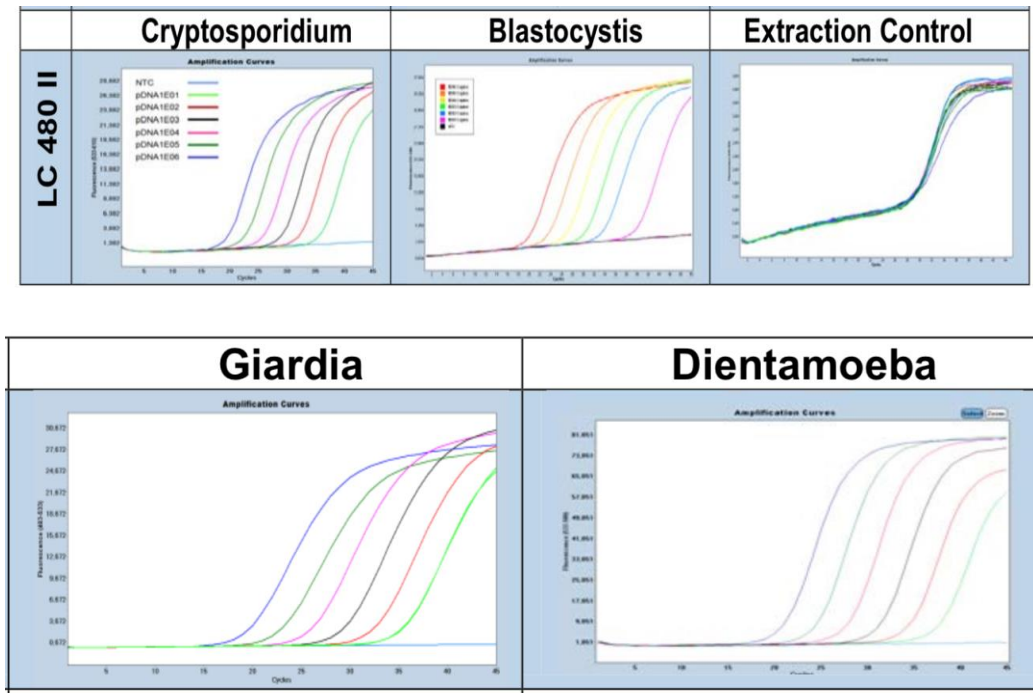


Figura 5. Vista de los resultados obtenidos en función del canal de color aplicado.

La siguiente tabla, es la salida del sistema para una lectura interpretada de los resultados.

500	530	580	610	640	660 Control	500-640 NTC	Result
negative	negative	negative	negative	negative	Detectable	negative	No parasites detectable
Cp < cutoff	negative	negative	negative	negative	irrelevant	negative	E.histolytica
negative	Cp < cutoff	negative	negative	negative	irrelevant	negative	Giardia
negative	negative	Cp < cutoff	negative	negative	irrelevant	negative	Dientamoeba
negative	negative	negative	Cp < cutoff	negative	irrelevant	negative	Cryptosporidium
negative	negative	negative	negative	Cp < cutoff	irrelevant	negative	Blastocystis
negative	negative	negative	negative	negative	negative	irrelevant	inhibition/failure Repeat
irrelevant	irrelevant	irrelevant	irrelevant	irrelevant	irrelevant	positive	Contamination Repeat

Tabla 10. Interpretación de los resultados en función del canal analizado.

A. Determinación de la sensibilidad de la técnica molecular

Se estudiaron 3 muestras de heces parasitadas con *Giardia lamblia* y consideradas microscópicamente como concentración parasitaria alta (aproximadamente 840 quistes/microL; muestra 1), media (aproximadamente 490 quistes/microL; muestra 2) y muy baja (aproximadamente 30 quistes/microL; muestra 3). De cada muestra se realizó una dilución seriada por duplicado, cuantificándose microscópicamente cada una (número de quistes de *Giardia lamblia* por microlitro) en cámara de Burker. La extracción se realizó en un equipo Magna Pure (Roche Diagnostics) y para ello las muestras fueron diluidas 1/10 en STAR buffer y pretratadas con MagNA Pure Bacteria Lysis Buffer.

La amplificación molecular, se realizó por PCR en tiempo real (LightMix® Modular *Giardia* Roche Diagnostics) amplificando un fragmento de 62 bp del gen 18s rRNA de *Giardia lamblia* en un equipo Cobas z480.

El límite de detección, se definió como la dilución más baja que mostraba resultado positivo en el 100% de los casos.

B. Estudio molecular de los casos discrepantes de las técnicas moleculares con las técnicas microscópicas

Para el análisis de los casos discrepantes de *Giardia* sp entre la microscopía y la técnica molecular se llevo a cabo la amplificación de DNA de *Giardia* sp de todos los casos discrepantes, y dos casos no discrepantes que se tomaron como control positivo de la prueba. Con la finalidad de que una vez amplificado el gen en las muestras fuera secuenciado en un laboratorio externo.

La amplificación del DNA se realizó siguiendo dos PCR:

B.1 Amplificación del gen de la beta giardina:

Se trata de una nested-PCR. Los cebadores utilizados han sido descritos previamente (Mahbubani et al, 1992) y fueron sintetizados por Roche Diagnostics.

Cebadores	Tamaño fragmento amplificado (pb)	
G7 (5'-AAGCCCGACGACCTCACCCGAGTGC-3')	753	
G759 (5'-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3')		
G376 (5'-CATAACGACGCCATCGCGGCTCTCAGGAA-3')		384

Tabla 11. Cebadores empleados en la amplificación del gen de la beta giardina.

Se emplearon las siguientes condiciones para amplificar el DNA:

Reactivos	Concentración final
DNA	5 µl

Tampón PCR	1x
Cebadores	10 pmol
dNTPs	200 μ M
Taq polimerasa	2,5 unidades

Tabla 12. Condiciones para la amplificación del gen de la beta giardina.

El volumen final de la reacción de ajustó con ddH₂O a 50 μ l.

B.2 Amplificación de un fragmento genético de RNA ssr:

Los cebadores utilizados han sido descritos previamente (Hopkins et al., 1997) y fueron sintetizados por Roche Diagnostics.

Cebadores	Tamaño fragmento amplificado (pb)
RH11 (5'-CATCCGGTCGATCCTGCC-3')	292
RH4 (5'-AGTCGAACCCTGATTCTCCGCCAGG-3')	

Tabla 13. Cebadores empleados en la amplificación del gen RNA ssr.

Se emplearon las siguientes condiciones para amplificar el DNA:

Reactivos	Concentración final
DNA	5 μ l

Tampón PCR	1x
Cebadores	10 pmol
dNTPs	200 μ M
Taq polimerasa	2,5 unidades

Tabla 14. Condiciones para la amplificación del gen RNA ssr.

El volumen final de la reacción se ajustó con ddH₂O a 50 μ l.

El proceso de amplificación para ambas PCR, se llevó a cabo de un termociclador Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler en las siguientes condiciones:

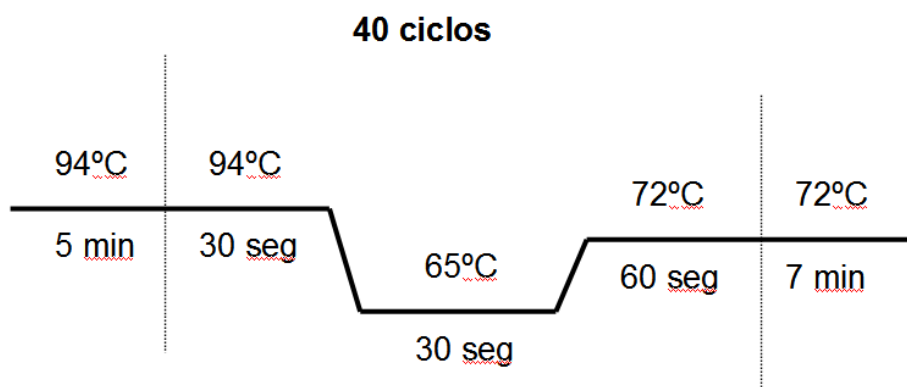


Figura 6. Proceso de amplificación para el gen de la beta giardina y para el gen RNA ssr.

Para la visualización de los fragmentos amplificados se realizó una electroforesis submarina en gel de agarosa en tampón TBE 0,5x.

Se mezcla 4 µl del producto de PCR con 1 µl de tampón de carga 5x y se dispensan en los pocillos del gel sumergido en TBE 0,5x. Se reserva un pocillo para el marcador de peso molecular (Escalera de 1500 pb). El gel se somete a electroforesis en tampón TBE 0,5x a 200V durante 1 hora. A continuación, se visualizaron las bandas amplificadas con un transiluminador de luz ultravioleta.

4.3.4 Métodos cromatográficos

Para la determinación de compuestos volátiles se utilizó el 4-metil-2-pentanol como patrón interno suministrado por Merck (Darmstadt, Germany) y cloruro sódico adquirido en Sigma Aldrich (Madrid, España).

A. Extracción y análisis de compuestos volátiles

Los compuestos volátiles fueron extraídos mediante extracción del espacio de cabeza estático (Static Headspace Extraction HS). Para ello, 3,5 g de heces fueron introducidos en un vial de 20 mL al que se le adicionaron 3,5 mL de una mezcla de agua destilada de cloruro sódico al 20 % para forzar el paso de los compuestos volátiles a la fase gaseosa. Seguidamente, se añadieron 10 µL de 4-metil-2-pentanol ($0,75 \text{ mgL}^{-1}$) como estándar interno. Para finalizar se cerró el vial con tapón de rosca de aluminio con septum de silicona/PETF (VWR International Eurolab S.L., Barcelona, España) y fue colocado en el carril del automuestreador del equipo.

Los análisis se llevaron a cabo en un Cromatógrafo de gases Thermo Scientific acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (TSQ8000-Thermo Scientific). equipado con un muestreador e inyector automático. La muestra en el

vial fue incubada durante 30 minutos a una temperatura de 50°C con agitación continua mientras tiene lugar el calentamiento. Transcurrido este tiempo, se tomaron 800 µL de gas del espacio de cabeza y se inyectaron en el cromatógrafo gaseoso empleando una jeringa de 1 mL de capacidad de calentada (50°C) en modo Split 10:1. La temperatura de inyección fue de 250°C y la y se analizó en una columna ZB-WAXplus (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm espesor, Zebron). El gas portador fue Helio a un flujo constante de 1 mL/min. La temperatura del horno comenzó a 40 °C manteniéndose un minuto para después subir a 100°C a razón de 2,5°C/min y a continuación hasta 200°C a razón de 15°C/min.

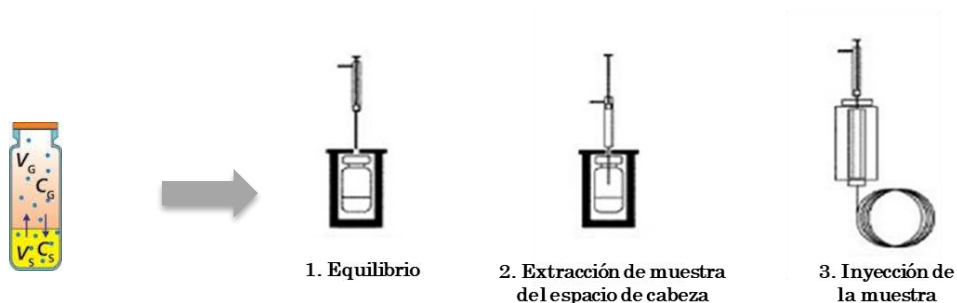


Figura 7. Proceso de extracción de compuestos volátiles del espacio de cabeza estático.

La temperatura de la línea de transferencia fue mantenida a 240°C. La adquisición de datos del espectro de ionización fue en modo SCAN (30-300 amu) y grabados a 70 eV de energía.

El procesamiento de los datos se realizó con el software Xcalibur™ (Thermo Fischer Scientific). La identificación de los compuestos fue llevada a cabo con la comparación de los espectros de masa obtenidos de cada molécula con los espectros de referencia de la librería de compuestos del software NIST 98. Además, se inyectó una serie de alcanos patrón (C7-C30) para calcular los índices Kovats con los que

se comparó los índices de retención de los compuestos de este estudio con los encontrados en la bibliografía para apoyar la identificación. Además, se calculó la abundancia relativa de cada compuesto con respecto al patrón interno 4-metil-2-pentanol.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Estudio de la etiología de causa infecciosa

1.1 Estudio de parásitos

1.1.1 Resultados del estudio microscópico

A. Examen microscópico directo sin concentración de las heces

El examen microscópico sin concentración detectó formas parasitarias en 32 (4,1%) de las muestras, siendo *Blastocystis* sp con 21 (2,7%) y *Giardia* sp con 11 (1,4%) los parásitos más prevalentes (tabla 15).

Examen en fresco	Número de pacientes	Porcentaje
<i>Blastocystis</i> sp	20	2,6%
<i>Giardia</i> sp	10	1,3%
<i>Blastocystis</i> sp y <i>Giardia</i> sp	1	0,1%
Negativo	745	95,9%
Total	777	100,0%

Tabla 15. Distribución de las muestras en función del resultado del estudio microscópico en fresco.

B. Examen microscópico tras concentración de las heces

El examen microscópico previa concentración, detectó formas parasitarias en el 46 (5,9%) de las muestras, siendo *Blastocystis* sp con 31 (4%) y *Giardia* sp con 13 (1,6%) los parásitos más prevalentes (tabla 16).

Examen tras concentración	Número de pacientes	Porcentaje
<i>Blastocystis</i> sp	30	3,9%
<i>Endolimax</i> sp	2	0,3%
<i>Giardia</i> sp	12	1,5%
<i>Blastocystis</i> sp y <i>Giardia</i> sp	1	0,1%
Negativo	731	94,1%
Total	777	100,0%

Tabla 16. Distribución de las muestras por resultado de estudio microscópico por concentración.

C. Coloración de *Kinyoun* modificada para *Cryptosporidium* sp

El examen microscópico tras coloración de *Kinyoun*, detectó formas parasitarias compatibles con *Cryptosporidium* sp en 8 (1%) de las muestras (tabla 17).

Tinción <i>Kinyoun</i>	Número de pacientes	Porcentaje
<i>Cryptosporidium</i> sp	8	1,0%
Negativo	769	99,0%
Total	777	100,0%

Tabla 17. Distribución de las muestras en función del resultado tras la tinción de *Kinyoun*.

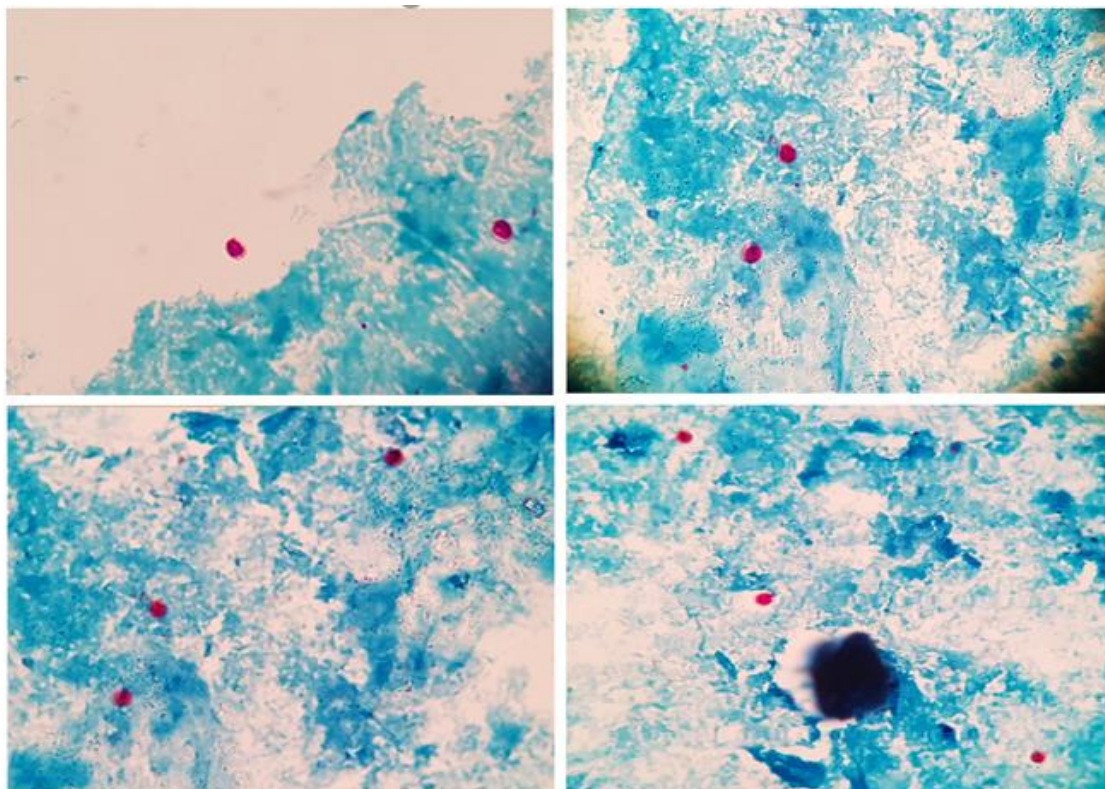


Figura 8. Tinciones de *Kinyoun* positivas correspondientes a los pacientes n° 12, 279, 1233, 1236.

D. Tinción de Auramina-Rodamina para *Cryptosporidium* sp

El examen microscópico tras tinción de inmunofluorescencia con auramina, detectó formas parasitarias compatibles con *Cryptosporidium* sp en 8 (1%) de las muestras (tabla 18).

Tinción de Auramina-Rodamina	Número de pacientes	Porcentaje
<i>Cryptosporidium</i> sp	8	1,0%
Negativo	769	99,0%
Total	777	100,0%

Tabla 18. Distribución de las muestras en función del resultado tras la tinción de Auramina-Rodamina.

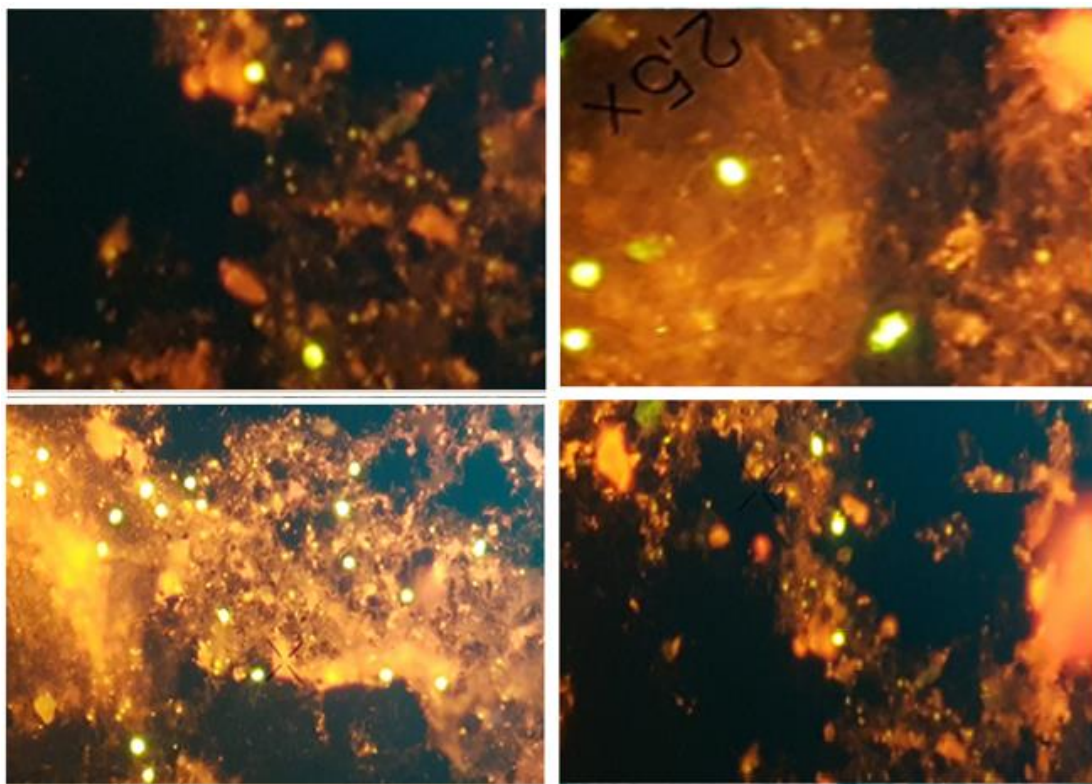


Figura 9. Tinciones de Auramina positivas correspondientes a los pacientes n° 147, 278, 1232, 1301.

1.1.2 Comparación de la microscopía con y sin concentración para la detección de parásitos

Las técnicas microscópicas con concentración proporcionaron mejor rendimiento que las pruebas sin concentración en la detección de parásitos, 46 vs 32 casos.

La comparación de ambas técnicas, se realizó con el módulo de comparación de técnicas diagnósticas del programa Epidat 3.1, tomando como referencia el examen microscópico con concentración y demostrando lo siguiente: se constató que las técnicas microscópicas con concentración para la detección de parásitos en niños con diarrea persistente presentaban una sensibilidad del 69,57% y una especificidad del 100%.

Nivel de confianza: 95,0%

Prueba diagnóstica	Prueba de referencia		Total
	Enfermos	Sanos	
Positivo	32	0	32
Negativo	14	731	745
Total	46	731	777

	Valor	IC (95%)	
Sensibilidad (%)	69,57	55,18	83,95
Especificidad (%)	100,00	99,93	100,00
Índice de validez (%)	98,20	97,20	99,20
Valor predictivo + (%)	100,00	98,44	100,00
Valor predictivo - (%)	98,12	97,08	99,16
Prevalencia (%)	5,92	4,20	7,64
Índice de Youden	0,70	0,56	0,83
Razón de verosimilitud +	-	-	-
Razón de verosimilitud -	0,30	0,20	0,47

1.1.3 Resultado del estudio molecular

El estudio molecular, detectó parásitos en 43 (5,5%) de las muestras, siendo *Blastocystis* sp con 25 (3,2%), *Giardia* sp con 8 (1%) y *Cryptosporidium* sp con 8 (1%) los más prevalentes (tabla 19).

Estudio molecular	Número de pacientes	Porcentaje
<i>Blastocystis</i> sp	25	3,2%
<i>Cryptosporidium</i> sp	8	1,0%
<i>Dientamoeba</i> sp	2	0,3%
<i>Giardia</i> sp	8	1,0%
Negativo	734	94,5%
Total	777	100,0%

Tabla 19. Resultados positivos del estudio de parásitos por técnicas moleculares.

Los ciclos de amplificación oscilaron entre 24-35 para *Blastocystis* sp, 27-38 para *Cryptosporidium* sp y 28-37 para *Giardia* sp, en la tabla 20 se puede observar los ciclos de amplificación en cada muestra.

Estudio molecular	Número de muestra	Ciclo de amplificación
<i>Blastocystis</i> sp	189	32
	359	29
	381	27
	599	27
	606	29
	632	32
	690	27
	704	34
	973	35
	976	33
	1120	34
	1160	26
	1185	33
	1191	34
	1225	32
1244	28	

	1251	32
	1275	24
	1279	29
	1290	27
	1302	29
	1337	27
	1338	31
<i>Cryptosporidium</i> sp	12	33
	147	27
	278	38
	279	27
	1232	32
	1233	29
	1301	29
<i>Dientamoeba</i> sp	1336	29
	44	33
	96	34
<i>Giardia</i> sp	82	35
	539	32
	951	28
	1016	35
	1107	37
	1258	35
	1310	33
	1338	35

Tabla 20. Relación entre las muestras positivas en el estudio molecular y el ciclo de amplificación.

1.1.4 Análisis en conjunto de los distintos métodos para el estudio de la etiología parasitaria

En la tabla 21, se muestra una comparativa del rendimiento de los distintos métodos empleados en la detección de los parásitos. Se observa que la técnica de concentración fue la que mejor rendimiento mostró a la hora de detectar los parásitos (46/777) aun teniendo en cuenta su incapacidad de detectar *Cryptosporidium* sp, la técnica molecular detectó 43/777 parásitos teniendo peor rendimiento respecto a la técnica de concentración en *Blastocystis* sp y *Giardia* sp con 31 vs 25 y 8 vs 13 respectivamente.

Método de detección	Ex. en fresco	Ex. por concentración	Tinción de Kinyoun	Tinción Auramina	Estudio molecular
<i>Blastocystis</i> sp	21	31	-	-	25
<i>Cryptosporidium</i> sp	-	-	8	8	8
<i>Dientamoeba</i> sp	0	0	-	-	2
<i>Giardia</i> sp	11	13	-	-	8
<i>Endolimax</i> sp	0	2	-	-	-

Tabla 21. Comparativa del rendimiento de los distintos métodos empleados en el estudio de parásitos.

En la tabla 22, se muestra el detalle de positividad de las distintas técnicas empleadas en relación a los niños estudiados.

Parásitos	Nº	Ex. en fresco	Ex. por concentración	Kinyoun	Estudio molecular
<i>Blastocystis</i> sp	65	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
	72	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
	73	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
	189	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
	359	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
	381	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
	599	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
	606	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
	632	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
	661	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
	690	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
	704	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
	973	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
	976	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
	996	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
	1115	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
	1120	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
	1160	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
	1185	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
	1191	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
	1225	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
	1244	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
	1251	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
	1275	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
	1279	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
	1290	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
	1302	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
	1323	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
	1325	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
	1337	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
1338	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	
	12	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo

<i>Cryptosporidium</i> sp	147	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
	278	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
	279	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
	1232	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
	1233	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
	1301	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
	1336	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
<i>Dientamoeba</i> sp	44	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
	96	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
<i>Endolimax</i> sp	2	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
	6	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
<i>Giardia</i> sp	82	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
	149	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
	358	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
	539	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
	787	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
	951	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
	1000	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
	1016	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
	1107	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
	1119	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
	1258	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
	1310	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
	1338	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo

Tabla 22. Resultado del estudio de parásitos en función de las técnicas empleadas

1.1.5 Comparación de las técnicas microscópicas vs moleculares para la detección de parásitos

En general, las técnicas microscópicas proporcionaron mejor rendimiento que las pruebas moleculares en la detección de parásitos, 54 vs 43 casos.

La comparación de ambas técnicas, se realizó con el módulo de comparación de técnicas diagnósticas del programa Epidat 3.1, tomando como referencia el examen microscópico junto a la técnica de auramina, demostró lo siguiente:

A. Comparación en general de ambas técnicas

A la vista de los resultados, se constató que las técnicas moleculares para la detección de parásitos en niños con diarrea persistente presentaban una sensibilidad del 79,6% y una especificidad del 100%.

Nivel de confianza: 95,0%

Prueba diagnóstica	Prueba de referencia		Total
	Enfermos	Sanos	
Positivo	43	0	43
Negativo	11	723	734
Total	54	723	777

	Valor	IC (95%)	
Sensibilidad (%)	79,63	67,96	91,30
Especificidad (%)	100,00	99,93	100,00
Índice de validez (%)	98,58	97,69	99,48
Valor predictivo + (%)	100,00	98,84	100,00
Valor predictivo - (%)	98,50	97,55	99,45
Prevalencia (%)	6,95	5,10	8,80
Índice de Youden	0,80	0,69	0,90
Razón de verosimilitud +	-	-	-
Razón de verosimilitud -	0,20	0,12	0,35

B. Comparación de la capacidad de detectar *Giardia* sp

En el caso de *Giardia* sp, se constató que las técnicas moleculares para la detección de parásitos en niños con diarrea persistente presentaban una sensibilidad del 61,5% y una especificidad del 100%.

Nivel de confianza: 95,0%

Prueba diagnóstica	Prueba de referencia		Total
	Enfermos	Sanos	
Positivo	8	0	8
Negativo	5	764	769
Total	13	764	777

	Valor	IC (95%)	
Sensibilidad (%)	61,54	31,25	91,83
Especificidad (%)	100,00	99,93	100,00
Índice de validez (%)	99,36	98,73	99,98
Valor predictivo + (%)	100,00	93,75	100,00
Valor predictivo - (%)	99,35	98,72	99,98
Prevalencia (%)	1,67	0,71	2,64
Índice de Youden	0,62	0,35	0,88
Razón de verosimilitud +	-	-	-
Razón de verosimilitud -	0,38	0,19	0,76

C. Comparación de la capacidad de detectar *Blastocystis* sp

En el caso de *Blastocystis* sp, se constató que las técnicas moleculares para la detección de parásitos en niños con diarrea persistente presentaban una sensibilidad del 80,6% y una especificidad del 100%.

Nivel de confianza: 95,0%

Prueba diagnóstica	Prueba de referencia		Total
	Enfermos	Sanos	
Positivo	25	0	25
Negativo	6	746	752
Total	31	746	777

	Valor	IC (95%)	
Sensibilidad (%)	80,65	65,12	96,17
Especificidad (%)	100,00	99,93	100,00
Índice de validez (%)	99,23	98,55	99,91
Valor predictivo + (%)	100,00	98,00	100,00
Valor predictivo - (%)	99,20	98,50	99,90
Prevalencia (%)	3,99	2,55	5,43

D. Comparación de la capacidad de detectar *Cryptosporidium* sp

En el caso de *Cryptosporidium* sp, la concordancia entre ambas pruebas fue del 100%.

1.1.6 Estudios complementarios de los resultados discrepantes entre las distintas técnicas de detección de parásitos

El análisis del rendimiento en la detección de parásitos entre la técnica de concentración y la plataforma molecular LightMix® Modular Gastro Parasite Multiplex Testing mostró 6 casos discrepantes en la capacidad de detección de *Blastocystis* sp y 5 de *Giardia* sp. Estas diferencias fueron estudiadas mediante métodos alternativos.

A. Evaluación de la sensibilidad en la detección de parásitos de la técnica molecular

En base a nuestra evaluación, la PCR LightMix® Modular *Giardia* presentó una sensibilidad de 10 quistes por μL . Por tanto, muestras con una concentración muy baja de *Giardia* lamblia (entre 10-1 quistes/ μL) circunstancia que ocurre en los casos de diarrea crónica, podrían ser negativas en el estudio molecular de las muestras fecales de estos pacientes. Aunque la técnica tiene un límite de detección de 3 copias de ADN parasitario, el pequeño volumen de muestra empleado en la extracción y la dificultad para la rotura de los quistes en el pretratamiento, puede limitar la utilidad como alternativa a la microscopia convencional (tabla 23 y 24).

Muestra	Concentración inicial (quistes/ μL)	Concentración tras dilución (quistes/ μL)							
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
n°1	843	428	227	109	52	23	11	5	3
	848	431	236	113	55	26	12	5	1
n°2	490	241	123	61	30	13	5	2	
	493	244	125	63	32	12	6	4	1
n°3	31	13	8	5					
	33	14	7	4	1				

Tabla 22. Concentración de las muestras estudiadas en la dilución seriada.

Dilución	Ciclo de detección								
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Muestra n°1	31,63	33,83	34,32	35,30	35,67	36,55	37,21	-	-
	31,61	33,85	34,34	35,32	35,71	36,68	37,23	-	-
Muestra n°2	32,60	34,10	34,98	35,23	36,13	37,17	-	-	-
	32,61	34,07	35,07	35,25	36,23	37,21	-	-	-
Muestra n°3	36,14	37,19	-	-	-	-	-	-	-
	36,25	37,06	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 24. Ciclo de amplificación de las muestras estudiadas en cada dilución realizada.

Análisis de los casos discrepantes de *Blastocystis* sp

Las muestras discrepantes en la detección de *Blastocystis* sp (pacientes: 65, 72, 73, 661, 996 y 1117) fueron reevaluadas por microscopía óptica y por tinción de Field, demostrándose de forma inequívoca que correspondían a formas parasitarias compatibles con *Blastocystis* sp.

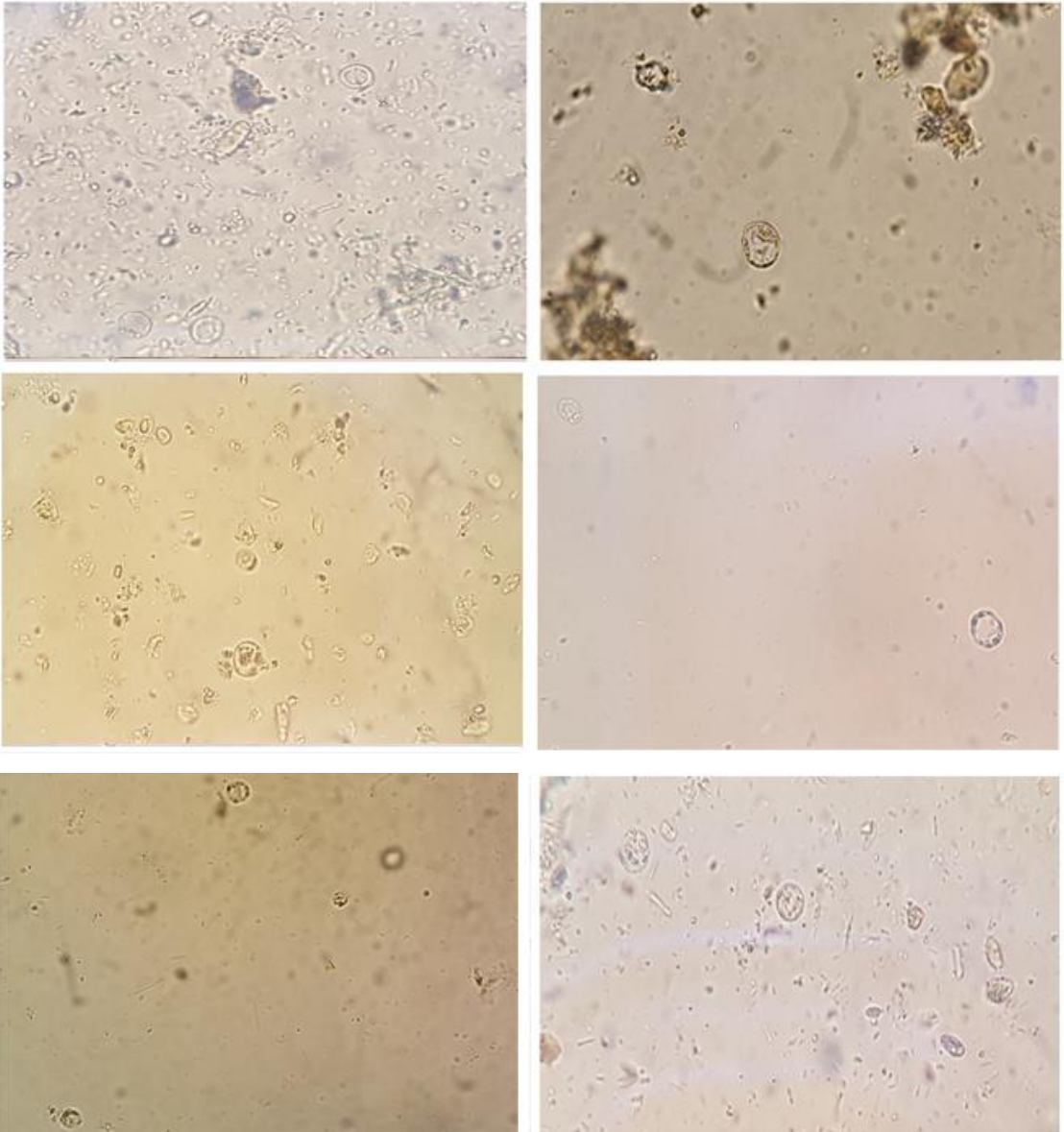


Figura 10. Imágenes microscópicas de los casos discrepantes correspondientes a *Blastocystis* sp.

Análisis de los casos discrepantes de *Giardia* sp

Las muestras discrepantes en la detección de *Giardia* sp (pacientes: 149, 358, 787, 1000 y 1119) fueron reevaluadas por microscopía óptica, microscopía de fluorescencia y por amplificación molecular mediante PCR *in house* y por técnicas cromatográficas.

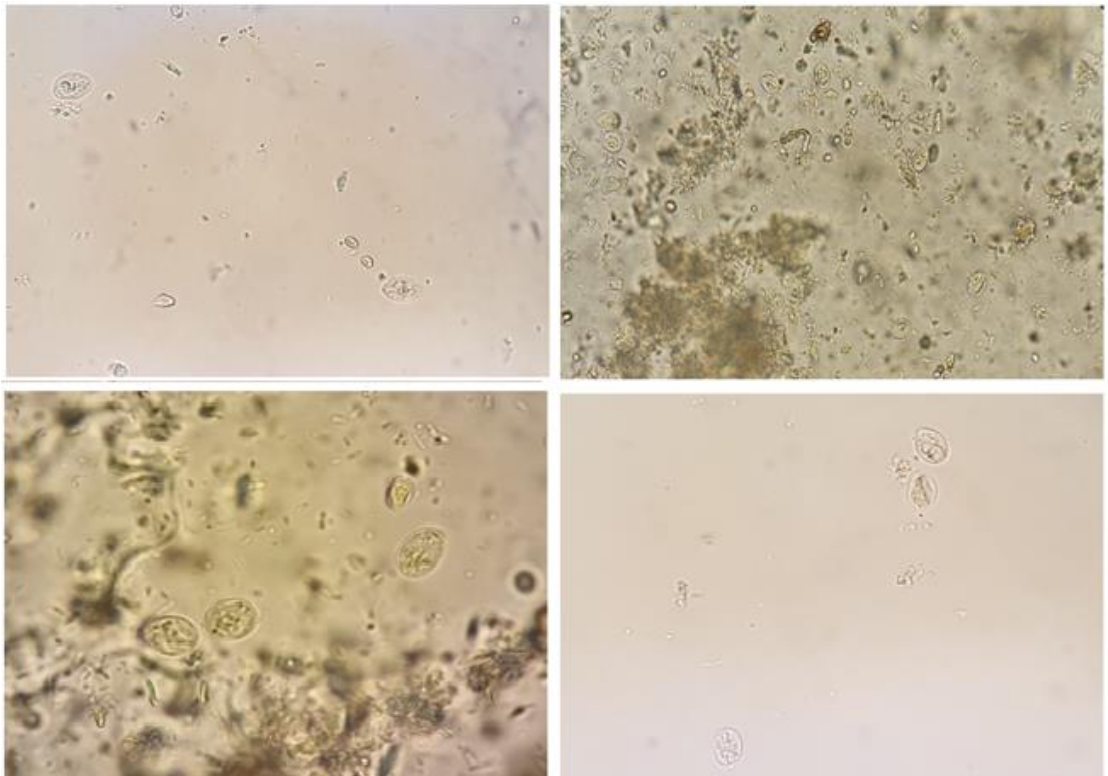


Figura 11. Imágenes microscópicas de los casos discrepantes correspondientes a *Giardia* sp.

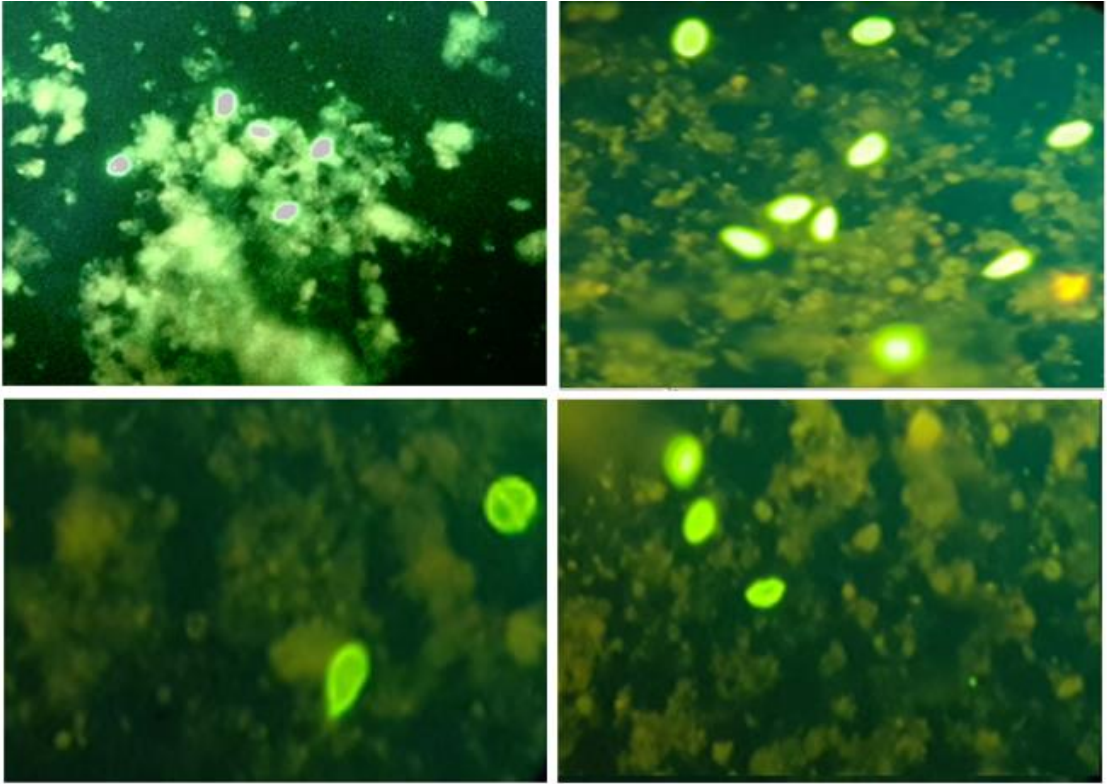


Figura 12. Imágenes por inmunofluorescencia de los casos discrepantes correspondientes a *Giardia* sp.

Las técnicas microscópicas mostraron de forma inequívoca que correspondían a formas parasitarias compatibles con *Giardia* sp. La técnica molecular, no amplificó ADN parasitario (Figura 8).

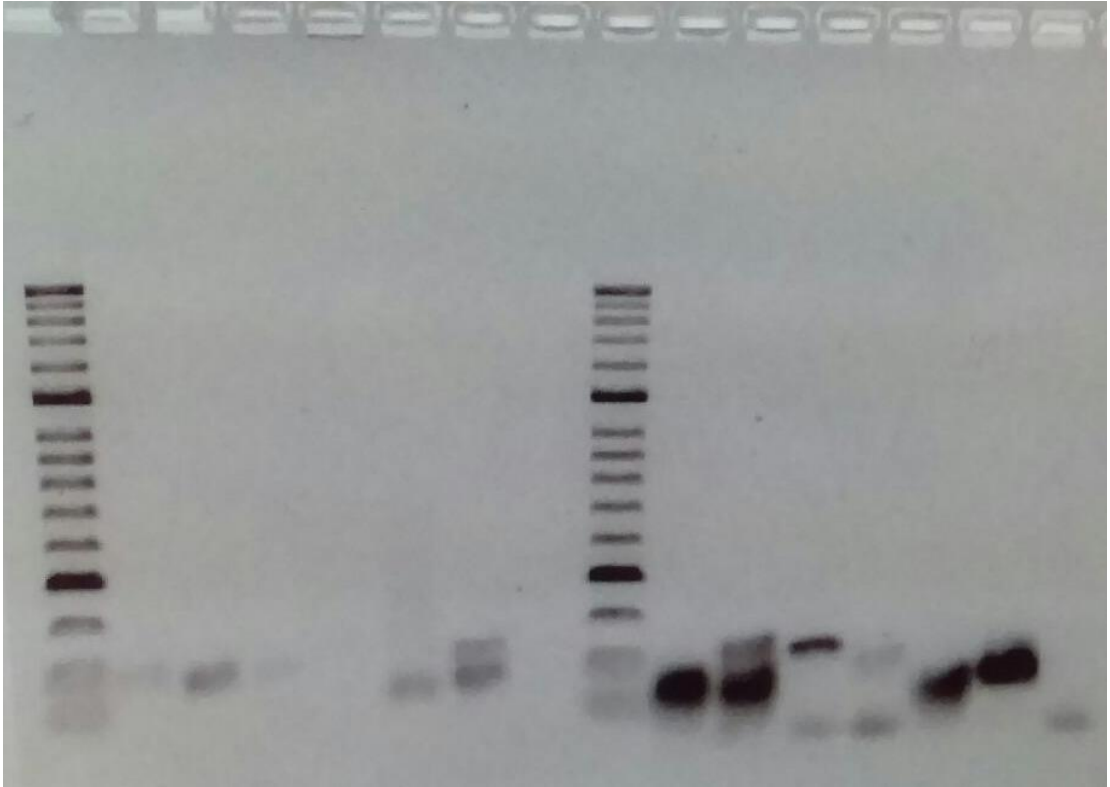


Figura 13. Electroforesis de los fragmentos amplificados en la PCR in house para estudio de los casos discrepantes de *Giardia* sp.

1.1.7 Características clínicas particulares de las parasitosis detectadas

La relación entre el motivo de petición y la presencia de parásitos en las muestras, se detalla en la tabla 26. Se observa que la diarrea persistente asociada a dolor abdominal, era el diagnóstico clínico más prevalente que se asociaba a la presencia de parásitos (32/55 casos de infección parasitaria).

Motivo de petición	Diarrea persistente	Diarrea persistente y dolor abdominal	Diarrea persistente y hematoquecia	Diarrea persistente y vomitos	Dolor abdominal y dolor ocular
<i>Blastocystis</i> sp	7	20	2	1	0
<i>Cryptosporidium</i> sp	0	6	2	0	0
<i>Dientamoeba</i> sp	2	0	0	0	0
<i>Endolimax</i> sp	0	1	1	0	0
<i>Giardia</i> sp	3	5	3	0	1
<i>Giardia</i> sp y <i>Blastocystis</i> sp	0	1	0	0	0

Tabla 25. Relación entre el motivo de petición y la presencia de parásitos en las muestras.

Las características clínicas de las parasitosis y los principales datos de laboratorio, se detallan en la tabla 26.

Edad	Sexo	Motivo de petición	Datos clínicos	Lecuo. fécales	Calpro-tecña	Cuerpos reductores	Digestión	Parásitos	Coproculativo	Virus
0,9	H	Diarrea persistente y dolor abdominal		Negativo	137	Negativo	Negativo	<i>Endolimax</i> sp	Negativo	Negativo
5	M	Diarrea persistente y hematoquecia	Sangre en heces	5 a 10	93	Negativo	Gránulos de almidón	<i>Endolimax</i> sp	Negativo	Negativo
10	M	Diarrea persistente y dolor abdominal	Dolor abdominal con episodios de diarrea intermitente, dolor de cabeza	Negativo	10	0,25%	Negativo	<i>Cryptosporidium</i> sp	Negativo	Negativo
1	H	Diarrea persistente	Deposiciones semilíquidas de tres semanas de evolución. Molestias abdominales generalmente periumbilical.	Negativo	139	Negativo	Negativo	<i>Dientamoeba</i> sp	Negativo	Negativo
6	M	Diarrea persistente	Molestias abdominales de 4 semanas de evolución	Negativo	10	Negativo	Negativo	<i>Blastocystis</i> sp	Negativo	Negativo
6	H	Diarrea persistente y dolor abdominal	Dolor abdominal de 1 mes de evolución con episodios de diarrea	Negativo	10	Negativo	Negativo	<i>Blastocystis</i> sp	Negativo	Negativo
7	H	Diarrea persistente y hematoquecia	Diarrea de evolución con hilos de sangre en algunas ocasiones	5 a 10	570	Negativo	Negativo	<i>Blastocystis</i> sp	Negativo	Negativo
3	M	Dolor abdominal y dolor ocular	Refiere dolor en boca y ojos. Cierta sialorrea. 1 mes antes de estudio abdominal.	Negativo	23	0,25%	Negativo	<i>Giardia</i> sp	Negativo	Negativo
4	H	Diarrea persistente		Negativo	10	Negativo	Negativo	<i>Dientamoeba</i> sp	Negativo	Negativo
7	H	Diarrea persistente y hematoquecia		<5	95	Negativo	<100 gotas	<i>Cryptosporidium</i> sp	Negativo	Negativo

Edad	Sexo	Motivo de petición	Datos clínicos	Lecuo. fecales	Calproteína	Cuerpos reductores	Digestión	Parásitos	Coprocultivo	Virus
1	H	Diarrea persistente y dolor abdominal	Deposiciones diarreas recurrentes. Dolor tipo cólico.	Negativo	219	Negativo	<100 gotas	<i>Cryptosporidium</i> sp	Negativo	Negativo
2	M	Diarrea persistente y hematoquecia	Estreñimiento alternado con deposiciones diarreas de un mes de evolución a veces con hilos de sangre	<5	65	0,25%	Negativo	<i>Cryptosporidium</i> sp	Negativo	Negativo
2	H	Diarrea persistente y dolor abdominal	Deposiciones pastosas de varias semanas. Diagnosticado de <i>comunitatis de dos</i>	Negativo	10	0,25%	Negativo	<i>Giardia</i> sp	Negativo	Negativo
2	H	Diarrea persistente y dolor abdominal	Dolor abdominal de semanas de evolución con episodios de diarrea. Déficit IgA y IgG.	Negativo	36	0,25%	Negativo	<i>Blastocystis</i> sp	Negativo	Negativo
7	M	Diarrea persistente y dolor abdominal	Dolor abdominal con episodios de diarrea	Negativo	10	Negativo	Negativo	<i>Blastocystis</i> sp	Negativo	Negativo
8	m	Diarrea persistente y dolor abdominal	Diarrea y dolor abdominal de 3 semanas de evolución.	<5	51	0,25%	<100 gotas	<i>Giardia</i> sp	<i>Salmonella</i> sp	Negativo
7	M	Diarrea persistente y dolor abdominal	Paciente con talasemia, serología de <i>Helicobacter</i> positiva.	Negativo	10	Negativo	Negativo	<i>Blastocystis</i> sp	Negativo	Negativo
6	H	Diarrea persistente y dolor abdominal	Dolor abdominal de 1 mes de evolución con diarrea. Dolor ocular dos semanas antes de estudio.	Negativo	10	Negativo	Negativo	<i>Blastocystis</i> sp	Negativo	Negativo
1	M	Diarrea persistente y dolor abdominal	Diarrea de semanas de evolución asociado a dolor abdominal	5 a 10	218	Negativo	Negativo	<i>Blastocystis</i> sp	<i>Campylobacter</i> sp	Negativo

Edad	Sexo	Motivo de petición	Datos clínicos	Lecuo. fécales	Calpro-tecmina	Cuerpos reductores	Digestión	Parásitos	Coproculativo	Virus
5	H	Dolor abdominal y diarrea persistente	Diarrea prolongada asociada a dolor abdominal	Negativo	10	0,25%	Negativo	<i>Giardia</i> sp	Negativo	Negativo
7	H	Diarrea persistente y hematoquecia	Diarrea y sangre en heces en las últimas deposiciones. Refiere llevar meses con misma clínica y ha empeorado en los últimos días, dolor ocular de repetición. Diagnosticado de <i>Giardia lamblia</i> .	<5	104	0,25%	Negativo	<i>Giardia</i> sp	Negativo	Negativo
12	M	Diarrea persistente y dolor abdominal	Dolor abdominal con episodios de diarrea de meses de evolución.	Negativo	10	Negativo	Negativo	<i>Blastocystis</i> sp	Negativo	Negativo
9	H	Diarrea persistente y vómitos	Cuadro de vómitos y diarrea prolongada	Negativo	10	Negativo	Negativo	<i>Blastocystis</i> sp	Negativo	Negativo
9	H	Dolor abdominal y diarrea persistente	Diarrea y dolor abdominal intermitente desde hace tres semanas. IgE.	Negativo	10	Negativo	Negativo	<i>Blastocystis</i> sp	Negativo	Negativo
4	H	Diarrea persistente	Diarrea de un mes de evolución. Alfa1-antitripsina ligeramente	Negativo	10	0,25%	Negativo	<i>Giardia</i> sp	Negativo	Negativo
4	H	Dolor abdominal y diarrea persistente	Diarrea crónica y dolor abdominal.	Negativo	10	0,50%	Negativo	<i>Giardia</i> sp	Negativo	Negativo
1	M	Diarrea persistente y hematoquecia	Diarrea prolongada con hilos de sangre, Disereto descenso. Dolor y sequedad	<5	150	0,25%	Negativo	<i>Giardia</i> sp	Negativo	Negativo
12	H	Dolor abdominal y diarrea persistente	Dolor abdominal con episodios de diarrea de larga evolución	Negativo	10	Negativo	Negativo	<i>Blastocystis</i> sp	Negativo	Negativo
1	H	Diarrea persistente	Pérdida de peso y diarrea persistente. Déficit IgA. Dolor y prurito ocular,	Negativo	233	0,25%	Negativo	<i>Giardia</i> sp	Negativo	Negativo

Edad	Sexo	Motivo de petición	Datos clínicos	Lecuo. fecales	Calprotectina	Cuerpos reductores	Digestión	Parásitos	Coproculativo	Virus
11	H	Diarrea persistente y dolor abdominal	Dolor abdominal y diarrea prolongada. Discreto déficit de IgA y elevación de IgE	Negativo	10	0,25%	Negativo	<i>Blastocystis</i> sp	Negativo	Negativo
6	H	Diarrea persistente y dolor abdominal	Dolor abdominal y diarrea prolongada	Negativo	10	Negativo	Negativo	<i>Blastocystis</i> sp	Negativo	Negativo
12	H	Diarrea persistente y dolor abdominal	Estudio por diarrea y dolor abdominal crónico	Negativo	17	Negativo	Negativo	<i>Blastocystis</i> sp	Negativo	Negativo
5	M	Diarrea persistente y dolor abdominal	Dolor abdominal y diarrea prolongada	Negativo	10	Negativo	Negativo	<i>Blastocystis</i> sp	Negativo	Negativo
10	H	Diarrea persistente	Diarrea de un mes de evolución	Negativo	10	Negativo	Negativo	<i>Blastocystis</i> sp	Negativo	Negativo
5	H	Diarrea persistente y dolor abdominal	Desde hace 3 meses, episodios de diarreas de característica líquida sin	<5	10	0,25%	<100 gotas	<i>Cryptosporidium</i> sp	Negativo	Negativo
11	H	Diarrea persistente y dolor abdominal	Diarrea de dos meses de evolución con dolor abdominal, dolor de cabeza	<5	10	Negativo	<100 gotas	<i>Cryptosporidium</i> sp	Negativo	Negativo
8	H	Diarrea persistente y dolor abdominal	Dolor abdominal con diarrea. Enfermedad inflamatoria intestinal	>10	873	1%	Negativo	<i>Blastocystis</i> sp	Negativo	Negativo
4	H	Diarrea persistente y hematoquecia	Sangre tras deposiciones desde hace unos dos meses. Fisura anal. Dolor con la deposición	5 a 10	105	0,25%	Negativo	<i>Giardia</i> sp	<i>Salmonella</i> sp	Negativo
12	H	Diarrea persistente y hematoquecia	Diarrea de meses de evolución con hilos de sangre en ocasiones	<5	102	Negativo	Negativo	<i>Blastocystis</i> sp	Negativo	Negativo

Edad	Sexo	Motivo de petición	Datos clínicos	Lecuo. fécales	Calpro-tecña	Cuerpos reductores	Digestión	Parásitos	Coproculativo	Virus
6	H	Diarrea persistente y dolor abdominal	Diarrea y dolor abdominal de meses de evolución	Negativo	10	Negativo	Negativo	<i>Blastocystis</i> sp	Negativo	Negativo
8	H	Diarrea persistente	Diarrea prolongada no filiada	Negativo	10	Negativo	Negativo	<i>Blastocystis</i> sp	Negativo	Negativo
13	M	Diarrea persistente y dolor abdominal	Dolor ocular dos meses antes del estudio abdominal, dolor de cabeza	Negativo	10	Negativo	<100 gotas	<i>Cryptosporidium</i> sp	Negativo	Negativo
9	H	Diarrea persistente y dolor abdominal	Diarrea y dolor abdominal <small>fibroscopio, InfZ</small>	Negativo	10	Negativo	Negativo	<i>Blastocystis</i> sp	Negativo	Negativo
11	H	Diarrea persistente	Diarrea recurrente, serología de Helicobacter positiva.	Negativo	10	Negativo	Negativo	<i>Giardia</i> sp	Negativo	Negativo
9	M	Diarrea persistente	Diarrea de un mes de evolución. Ligero descenso de IgA	Negativo	10	Negativo	Negativo	<i>Blastocystis</i> sp	Negativo	Negativo
5	M	Diarrea persistente y dolor abdominal	Diarrea y dolor abdominal de un mes de evolución. Ligero descenso de IgA	Negativo	10	Negativo	Negativo	<i>Blastocystis</i> sp	Negativo	Negativo
10	H	Diarrea persistente y dolor abdominal	Dolor abdominal de meses de evolución con episodios de diarrea	Negativo	10	0,25%	<100 gotas	<i>Cryptosporidium</i> sp	Negativo	Negativo
9	H	Diarrea persistente	Diarrea prolongada	Negativo	34	Negativo	Negativo	<i>Blastocystis</i> sp	Negativo	Negativo
9	M	Diarrea persistente y dolor abdominal		Negativo	34	Negativo	Negativo	<i>Giardia</i> sp y <i>Blastocystis</i> sp	Negativo	Negativo

Tabla 26. Características clínicas de los casos de parasitosis estudiados.

Los datos clínicos más importantes por tipo de parásito fueron los siguientes:

A. *Blastocystis* sp

La mediana de edad de los niños *Blastocystis* sp fue de 7 años (rango: 1-14 años).

El motivo principal de solicitud de los estudios fue el de diarrea prolongada con dolor abdominal (66,6 casos), seguida de diarrea persistente (23,3%), siendo las restantes diarrea persistente con hematoquecia (2 casos) y diarrea persistente asociada a vómitos (1 caso). Tras la revisión de la Historia de Salud, en 5/30 casos se constató déficit de IgA, enfermedad celiaca en 2/31, enfermedad inflamatoria intestinal en 1/31. En dos casos, la presencia de *Blastocystis* sp estuvo asociada a infección bacteriana por *Campylobacter* sp y *Salmonella* sp.

En seis de los casos se constató valores de calprotectina elevados (>50 µg/g) y estaban asociados a los episodios de diarrea bacteriana, enfermedad inflamatoria intestinal o hematoquecia.

En cinco casos se detectó la presencia de azúcares reductores o grasas en las heces, pero asociados a enfermedad inflamatoria intestinal, celiaquía o déficit de IgA.

En uno de los casos, se constató dolor ocular, en este caso los niveles de calprotectina eran superiores a 50 µg/g.

Motivo petición	Calpro- tectina	Malabsorción/ Maladigestión	Coprocultivo	Datos clínicos
Diarrea persistente	<10	No	Negativo	Deposiciones semilíquidas de tres semanas de evolución. Molestias abdominales.
	<10	No	Negativo	Diarrea de 1 mes de evolución
	<10	No	Negativo	Diarrea prolongada no filiada
	<10	No	Negativo	Ligero déficit de IgA
	<10	No	Negativo	Ligero déficit de IgA
	34	No	Negativo	Diarrea prolongada
	114	No	<i>Salmonella</i> sp	Diarrea de 20 días de evolución de consistencia líquida.
Diarrea persistente y dolor abdominal	<10	No	Negativo	Diarrea y dolor abdominal de meses de evolución.
	<10	No	Negativo	Diarrea y dolor abdominal intermitente desde hace tres semanas, IgE discretamente elevada.
	<10	No	Negativo	Diarrea y dolor abdominal tipo crónico, IgG discretamente disminuida.
	<10	No	Negativo	Dolor abdominal con episodios de diarrea de meses de evolución.
	<10	No	Negativo	Dolor abdominal con episodios de diarrea persistente
	<10	No	Negativo	Dolor abdominal con episodios de diarrea de larga evolución
	<10	No	Negativo	Dolor abdominal de 1 mes de evolución con episodios de diarrea
	<10	No	Negativo	Dolor abdominal y diarrea prolongada
	<10	No	Negativo	Diarrea prolongada en paciente con talasemia, serología de <i>Helicobacter</i> positiva.
	<10	No	Negativo	Refiere desde hace semanas diarrea con dolor abdominal frecuente con cefaleas que mejoran tras deposición
	<10	Si	Negativo	Dolor abdominal crónico asociado a diarrea intermitente de meses de evolución. Ac antitrasglutaminasa y anti endomisio +++ (enfermedad celiaca)
	<10	No	Negativo	Dolor abdominal de 2 meses de evolución con déficit de IgA y celiaquía.
	<10	No	Negativo	Dolor abdominal y diarrea prolongada. Discreto déficit de IgA y elevación de IgE
	17	No	Negativo	Estudio por diarrea y dolor abdominal crónico

	36	Si	Negativo	Dolor abdominal de semanas de evolución con episodios de diarrea. Déficit IgA e IgG
	184	No	Negativo	Dolor abdominal de 1 mes de evolución con diarrea. Presentó dolor ocular dos semanas antes del estudio.
	218	No	<i>Campylobacter</i> sp	Diarrea de semanas de evolución asociado a dolor abdominal
	873	Si	Negativo	Dolor abdominal con diarrea. Enfermedad inflamatoria intestinal
Diarrea persistente e y hemato-	102	No	Negativo	Diarrea de meses de evolución con hilos de sangre en ocasiones
	570	No	Negativo	Diarrea de evolución con hilos de sangre en algunas ocasiones
Diarrea persistente y vómitos	<10	No	Negativo	Cuadro de vómitos y diarrea prolongada

Tabla 27. Datos clínicos de los casos positivos a *Blastocystis* sp detectados.

B. *Cryptosporidium* sp

La edad de los niños osciló entre 1 y 13 años, con una mediana de 7 años. El motivo principal de solicitud de los estudios fue el de diarrea prolongada con dolor abdominal en el 75% de los casos, seguida de diarrea persistente asociada a hematoquecia en el 25% restante.

Todos los pacientes (100%), presentaban malabsorción de azúcares o grasas. En tres niños se objetivaron valores de calprotectina elevados (valores entre 65-219 µg/g), dos estaban asociados a episodios de hematoquecia y el otro a diarrea persistente con dolor abdominal, pero no se pudieron obtener datos clínicos adicionales.

Tras la revisión de la Historia de Salud, no se constataron datos adicionales, aunque tres de los niños presentaban dolores de cabeza y uno dolor ocular.

Motivo petición	Calprotectina	Malabsorción/ Maladigestión	Coprocultivo	Datos clínicos
Diarrea persistente y dolor abdominal	<10	Si	Negativo	Desde hace 3 meses, episodios de diarreas de característica líquida sin productos patológicos acompañados de dolor abdominal tipo cólico.
	<10	Si	Negativo	Diarrea de dos meses de evolución con dolor abdominal
	<10	Si	Negativo	Dolor abdominal con episodios de diarrea intermitente, dolor de cabeza.
	<10	Si	Negativo	Dolor abdominal de meses de evolución con episodios de diarrea
	<10	Si	Negativo	Dolor ocular dos meses antes del estudio abdominal, dolor de cabeza, dolor de cabeza.
	219	Si	Negativo	Deposiciones diarreicas recurrentes. Dolor tipo cólico
Diarrea persistente y hematoquecia	65	Si	Negativo	Refiere hace un mes estreñimiento alternando con deposiciones diarreicas posteriores. A veces hilos de sangre.
	95	Si	Negativo	Deposiciones diarreicas de 3 semanas de evolución con algunos hilos de sangre. Dolor abdominal tipo cólico.

Tabla 28. Datos clínicos de los casos positivos a *Cryptosporidium* sp detectados.

C. *Giardia* sp

La edad de los niños osciló entre 2 y 11 años, con una mediana de 4 años.

El motivo clínico principal asociado a la solicitud de estudio de parásitos en los episodios de giardiasis, se basó en una sintomatología de diarrea persistente asociada a dolor abdominal en un 46,2% de los casos, seguido de diarrea persistente sin dolor abdominal (23,1% de los casos) y la asociada a hematoquecia (23,1% de los casos).

Otros hallazgos en las heces, asociados a la presencia de *Giardia* sp:

-En el 85% de los casos de parasitosis por *Giardia* sp de nuestro estudio se detectó la presencia de azúcares reductores o grasas en las heces.

-En 5 (38,5%) de los niños se constató que las heces tenían características inflamatorias, con niveles de calprotectina que oscilaron entre 46 y 233 mcg/g, en dos casos asociados a infección concomitante por *Salmonella* sp, en uno asociado a exacerbación de una enfermedad inflamatoria intestinal, en los dos restantes no había datos clínicos complementarios en la historia pero en uno de ellos estaba asociado a hematoquecia (un signo de alarma de enfermedad inflamatoria intestinal) y el otro a episodios de diarrea persistente con dolor abdominal y déficit de IgA., en total, tres niños (23%) presentaban déficit de IgA.

-En 6 casos (46,1%), se constató manifestaciones extraintestinales de la infección, en forma de trastornos oculares, se constató que en dos de los casos los niños fueron derivados al oftalmólogo siendo el resto de los episodios manejados por su pediatra. En la mayoría de los casos se objetivó dolor ocular y los pacientes fueron diagnosticados de conjuntivitis.

En conjunto, en 10/13 (76,9%) de los casos la presencia de *Giardia* sp estuvo asociada a alteraciones inmunológicas o inflamatorias.

En la tabla 30 se pueden observar con detalle las características de laboratorio y clínicas asociadas a la presencia de *Giardia* sp.

Motivo petición	Calprotectina	Malabsorción/ Maladigestión	Coproactivo	Datos clínicos
Diarrea persistente	<10	No	Negativo	Diarrea recurrente, serología de Helicobacter positiva.
	<10	Si	Negativo	Diarrea de un mes de evolución, Ig dentro de los niveles normales. Alfa1-antitripsina: 203,3 mg/dl (90-200)
	233	Si	Negativo	Pérdida de peso y diarrea persistente. Déficit IgA (IgA: 23,6 (90-400) IgG: 312,7 (840-1860)). Dolor y prurito ocular, diagnosticado de conjuntivitis.
Diarrea persistente y dolor abdominal	<10	Si	Negativo	Deposiciones pastosas desde hace varias semanas, no se relaciona con comidas, algunos vómitos. Diagnosticado de conjuntivitis de dos semanas de evolución, semanas de antes del estudio abdominal.
	<10	Si	Negativo	Diarrea crónica y dolor abdominal.
	<10	Si	Negativo	Diarrea prolongada asociada a dolor abdominal
	46	Si	Negativo	Diarrea y dolor abdominal y eosinofilia, inmunoglobulinas en suero con discreto descenso de IgG y IgA y eosinofilia. Semanas antes refiere dolor ocular y prurito.
	51	Si	<i>Salmonella</i> sp	Diarrea y dolor abdominal de 3 semanas de evolución. Se retira lactosa de la dieta, test de aire espirado negativo.
Diarrea persistente y hematoquecia	104	Si	Negativo	Diarrea y sangre en heces en las ultimas deposiciones. Refiere llevar meses con misma clínica y ha empeorado en los últimos días, dolor ocular de repetición. Diagnosticado de colitis ulcerosa en tratamiento con infliximab.
	105	Si	<i>Salmonella</i> sp	Emisión de sangre roja tras deposiciones desde hace unos dos meses. Fisura anal. Dolor con la deposición
	150	Si	Negativo	Diarrea prolongada con hilos de sangre, Discreto descenso IgA: 52,50 (85-390). Dolor y sequedad ocular.
Diarrea persistente, dolor abdominal y dolor	23	Si	Negativo	Diarrea persistente, refiere dolor en boca y ojos. Cierta sialorrea. Un mes antes estudio abdominal.
Diarrea persistente y dolor abdominal	<10	No	Negativo	

Tabla 29. Datos clínicos de los casos positivos a *Giardia* sp detectados.

D. *Dientamoeba* sp, *Endolimax* sp

Dientamoeba sp: respecto a las características clínicas de los dos casos, se constató que en ambos el motivo clínico de estudio fue un síndrome de diarrea persistente, En uno de los casos la presencia de *Dientamoeba* sp estaba asociada a valores de calprotectina elevados y coprocultivo negativo.

Endolimax sp: respecto a la sintomatología clínica que motivó el estudio de parásitos, uno de los niños presentaba diarrea persistente y dolor abdominal, y otro diarrea persistente asociada a hematoquecia, ambos con niveles de calprotectina elevados y coprocultivo negativo.

1.2 Estudio de bacterias y virus

1.2.1 Resultados del estudio de bacterias

De las 777 muestras estudiadas, en 31 (4%) de las muestras se aislaron bacterias de interés clínico, siendo *Campylobacter* sp la bacteria más prevalente con 19 casos (2,4%) seguida de *Salmonella* sp con 11 (1,5%) de los casos, en 3 casos la infección fue por más de un microorganismo (tabla 12).

Resultado del coprocultivo	Número de pacientes	Porcentaje
<i>Aeromonas</i> sp	1	0,1%
<i>Campylobacter</i> sp	18	2,3%
<i>Campylobacter</i> sp y <i>Aeromonas</i> sp	1	0,1%
<i>Salmonella</i> sp	9	1,2%
<i>Salmonella</i> sp y <i>Aeromonas</i> sp	2	0,3%
Negativo	746	96,0%
Total	777	100%

Tabla 30. Distribución de las muestras en función del resultado del coprocultivo.

La correspondencia entre el motivo clínico de petición y los aislamientos mostró que el 48% de los casos correspondían a diarrea persistente con dolor abdominal y el 32% a diarrea persistente (tabla 13).

En cuatro pacientes, se detectaron parásitos asociados a la diarrea bacteriana: *Giardia* sp (2 casos) y *Blastocystis* sp asociados a diarrea por *Salmonella* sp y un caso de *Blastocystis* sp asociado a diarrea por *Campylobacter* sp.

Resultado del coprocultivo	Motivo de la petición	Número de pacientes
<i>Aeromonas</i> sp	Diarrea persistente y fiebre	1
<i>Campylobacter</i> sp	Diarrea persistente	6
	Diarrea persistente y dolor abdominal	11
	Diarrea persistente y vómitos	1
<i>Aeromonas</i> sp y <i>Campylobacter</i> sp	Diarrea persistente	1
<i>Salmonella</i> sp	Diarrea persistente	2
	Diarrea persistente y dolor abdominal	5

	Diarrea persistente y hematoquecia	2
<i>Aeromonas sp y Salmonella sp</i>	Diarrea persistente	1
	Diarrea persistente y hematoquecia	1
Total		777

Tabla 31. Distribución de las muestras en función del resultado del coprocultivo y motivo de petición.

1.2.2 Resultados del estudio de virus

La etiología vírica fue poco prevalente, detectándose en 2 (0,3%) de los casos y correspondiendo ambos a infección por Adenovirus (tabla 14). No se detectaron casos de etiología por Rotavirus.

	Motivo de petición	Número de pacientes
Adenovirus	Diarrea persistente	1
	Diarrea persistente y dolor abdominal	1
Negativo		775
Total		777

Tabla 32. Distribución de las muestras en función del estudio de virus en heces.

1.3 Análisis de los resultados obtenidos de etiología de causa infecciosa

Las infecciones causadas por bacterias, virus o parásitos a veces causan diarrea persistente. Después de una infección aguda, algunos niños tienen problemas para

digerir carbohidratos, caso de la lactosa o proteínas, como leche o proteínas de soja. Estos problemas pueden causar diarrea persistente, a menudo durante más de 6 semanas, después de la infección. Además, algunas bacterias e infecciones parasitarias que causan diarrea no se controlan rápidamente sin tratamiento (Fleisher, 2017). En este estudio, la etiología infecciosa se puso de manifiesto en el 11,4% de los casos de diarrea persistente (7,1% de origen parasitario) coincidiendo con lo publicado en otros estudios realizados en países desarrollados (Ochoa et al., 2004; Bhutta et al., 2008).

1.3.1 Análisis de los resultados de bacterias y virus

En los 777 niños estudiados, *Campylobacter* sp era la etiología bacteriana más prevalente asociada a un 2,6% de los casos. Estos resultados inciden sobre la importancia de no considerar exclusivamente a *Campylobacter* sp como un microorganismo causante de casos de diarrea aguda ya que actualmente es una causa conocida de diarrea persistente en niños (Pawlowski et al., 2009). Aunque, la infección por *Campylobacter jejuni* está reconocida como la primera causa de diarrea aguda en el mundo (Altekruse et al., 1999), cada vez más estudios sugieren que las consecuencias de la enfermedad no se limitan a la enfermedad aguda (Riddle et al., 2012) y que las infecciones por *Campylobacter jejuni* podrían mostrar recurrencia en niños (Smalley et al., 1982) y en adultos con deficiencias de inmunoglobulinas (Janssen et al., 2008; Kellermayer et al., 2017). Aunque, estudios más antiguos sugieren considerar la enterocolitis por *Campylobacter jejuni* en el diagnóstico diferencial en lactantes con diarrea crónica, especialmente si hay sangre en las heces (Heyman et al., 1982), nuestro estudio no puso de manifiesto esta circunstancia en el diagnóstico inicial, lo que por otro lado aparece en las publicaciones como asociado a los casos agudos de la enfermedad (Riddle et al., 2012).

La segunda causa bacteriana de diarrea persistente en nuestro estudio fue *Salmonella* sp con un 1,7% de los casos. Este resultado, concuerda con otros estudios que demuestran que *Salmonella* sp es una causa conocida de diarrea persistente en niños (Pawlowski et al., 2009) y aunque la infección generalmente es autolimitada (de tres a siete días); la persistencia de la sintomatología en niños está descrita (Crum-Cianflone et al., 2008) y al menos el 2% de las infecciones agudas evolucionaron a una infección persistente con la misma cepa durante meses o incluso años, que a menudo se manifiesta como una recaída sintomática (Marzel et al., 2016). Aunque no bien caracterizadas, estas infecciones persistentes parecen asociarse al tratamiento previo con antibióticos y las edades tempranas de la vida (Buchwald et al., 1984; Sirinavin et al., 1999). En los niños, la clínica más frecuente, es la asociación de dolor abdominal, en nuestro estudio más de la mitad de los casos estaban asociados a dolor abdominal. Aunque, ocasionalmente la presentación clínica de la diarrea persistente por *Salmonella* sp puede imitar a la enfermedad inflamatoria intestinal, pero es poco común (Dagash et al., 1997) y no ha sido puesto en evidencia en nuestro estudio.

Aeromonas sp con 4 de los casos (0,4%) estuvo asociado a episodios de diarrea persistente en nuestro estudio. Aunque la asociación con enteritis es aún controvertida, *Aeromonas* spp ha sido asociada a distintos síndromes clínicos entre ellos la diarrea aguda y crónica asociada a dolor abdominal y vómitos (Agger et al., 1985; San Joaquin et al., 1988) y de que los episodios de diarrea crónica en niños inmunocompetentes que pueden mantenerse durante más de un año (Holmber et al., 1984) sobre todo en niños pequeños (menores de 3 años) (Cohen, 1991). En nuestro estudio los cuatro niños tenían un año de edad. Además, en 3 de los casos el aislamiento de *Aeromonas* estaba asociado a *Campylobacter* sp o *Salmonella* sp, este aspecto ha sido comunicado en niños con diarrea persistente en países en desarrollo (Pazzaglia et al., 1991).

En este estudio, los casos de diarrea crónica asociada a virus fueron escasos, 0,3% y únicamente causados por Adenovirus. Este aspecto, no es llamativo, ya que la enteritis por Adenovirus tiende a prolongarse más tiempo (hasta 2 semanas) que la enfermedad causada por otros virus entéricos. Los adenovirus entéricos presentan incidencias variables de infección. En los países industrializados, la incidencia varía de 1% a 8% (Kotloff et al., 1989). Pero no existen estudios que valoren su prevalencia en casos de diarrea persistente. Los dos casos detectados, estuvieron asociados a diarrea persistente y uno de ellos a dolor abdominal, este aspecto podría relacionarse con la relación de Adenovirus con adenitis mesentérica, pero no existen estudios que analicen la clínica de los casos persistentes de diarrea, aunque en los casos agudos se asocian a episodios de náuseas seguido del desarrollo de diarrea acuosa.

1.3.2. Asociación entre diarrea bacteriana y parásitos

En cuatro de los episodios de diarrea bacteriana, se detectaron también parásitos, en dos casos de diarrea persistente por *Salmonella* sp se detectaron quistes de *Giardia* sp y en un caso de diarrea por *Campylobacter* sp y otro por *Salmonella* sp se detectaron formas compatibles con *Blastocystis* sp. Es decir, en el 13% de los casos de diarrea bacteriana se asociaban a parasitosis. Este aspecto, está poco reseñado en la literatura, aunque se ha comunicado la coexistencia de infección bacteriana con *Cryptosporidium* sp (Moore et al., 2002) aunque en nuestro estudio no se ha puesto en evidencia. Además, estudios epidemiológicos demuestran que la asociación de *Giardia* sp con otras infecciones entéricas no afecta a la clínica producida por otros patógenos entéricos (Bilenko et al., 2004). La asociación de infección bacteriana y *Blastocystis* sp no ha sido comunicada en nuestro estudio. Uno de los casos asociado a *Campylobacter* sp presentaba una clínica de diarrea de

varias semanas de evolución asociada a dolor abdominal y el otro asociado a *Salmonella* sp presentaba una diarrea acuosa de 20 días de evolución.

1.3.3 Importancia de los parásitos en la diarrea crónica

Nuestro estudio detectó en el 7,1% de las muestras de niños con diarrea persistente de nuestra área sanitaria la presencia de parásitos. Cuando se estratificaron estos resultados en función del tipo de parásitos, se observó que el 2,6% correspondían a parásitos considerados clásicamente patógenos (*Giardia* sp y *Cryptosporidium* sp) y el 4,6% restante a parásitos considerados de dudoso valor patógeno (*Blastocystis* sp, *Dientamoeba* sp y *Endolimax* sp).

En España, no existen estudios específicos que evalúen la importancia de la infección parasitaria en niños con diarrea persistente. De forma que los estudios disponibles evalúan la prevalencia en niños sintomáticos y asintomáticos. En las dos últimas décadas, sólo hay tres estudios disponibles. El primero, realizado en Cataluña con datos de 1999 a 2005 (González-Moreno et al., 2011), encuentra una prevalencia de parásitos en niños hospitalizados y procedentes de atención primaria del 10,7%, en muestras de pacientes con trastornos digestivos (flatulencia, diarrea, calambres abdominales, malabsorción, hematoquezia, intestino irritable o síntomas extraintestinales), siendo las especies más prevalentes *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* y *Blastocystis hominis*. El segundo, realizado en Valencia entre 2009 y 2010 (Chover et al., 2010), en niños asintomáticos de educación infantil y primaria, y que incluía niños la población general e inmigrante comunicaba una prevalencia general de infección del 27,4%, que alcanza el 40,52% en inmigrantes, siendo las más frecuentes: *Blastocystis hominis* (14,9%) y *Giardia lamblia* (6,1%), no detectándose *Cryptosporidium parvum*. El otro estudio realizado en Sevilla (Coronel et al., 2017), incluía los parásitos detectados en heces enviadas por Centros de Atención Primaria durante

el período 2010-2014 al Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen del Rocío, de Sevilla. Este estudio encuentra una prevalencia general de parásitos del 9,3%, siendo *Giardia lamblia* el parásito más frecuente, seguido de *Blastocystis*, aunque en menores de un año fueron *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* y en el grupo de edad de 10-14 años fueron *Blastocystis hominis* y *Giardia lamblia*. Estos estudios, aunque poco comparables con el realizado en este trabajo, coincidían respecto al nuestro en los parásitos mas prevalentes.

Nuestros resultados donde se constata una prevalencia de parasitos considerados patógenos del 2,6%, coinciden con otros estudios internacionales que demuestran que los parasitos intestinales son una etiología poco común de diarrea persistente en países desarrollados. Así, en un estudio realizado en Canadá en 2012 durante un periodo de 5 años solo detectó la presencia de parásitos en en 1,4% de las muestras estudiadas, coincidiendo con los resultados de un estudio multicéntrico realizado en 2011 en niños norteamericanos, donde la prevalencia de parasitos se situaba en el 1,4-1,5% de los niños estudiados (Mosli et al., 2012). En ambos estudios *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum* fueron los parasitos mas comunicados. Otro estudio realizado en niños norteamericanos con diarrea persistente, no demostró la presencia de parásitos (Vernacchio et al., 2006). En general, la prevalencia de parasitos en pacientes con diarrea crónica en países industrializados oscila entre el 2 y el 5% (Escobedo et al., 2014).

Lo anterior, contrasta con lo comunicado en niños de países con recursos limitados donde en el 82% de los niños con síndrome de malabsorción se detectan parásitos (tanto patógenos como no patógenos) (Behera et al., 2008), siendo una etiología bien contrastada en el síndrome de diarrea persistente (Moore, 2017).

Como consecuencia las guías internacionales mas actuales de manejo de la diarrea persistente en niños consideran la infección parasitaria como una causa poco común de diarrea persistente en niños de paises desarrollados (Kellermayer et al., 2017). Esta circunstancia, en general no es tomada en cuenta en las guías de estudio

de la diarrea crónica y/o persistente en nuestro país (Vila et al., 2005) donde se recomienda de forma sistemática un estudio detallado de parásitos en su diagnóstico diferencial.

En base a los resultados de este estudio, sería importante reconsiderar, el papel de la etiología de la infección parasitaria en niños con diarrea persistente en España, asimilándolo al de otros países industrializados y proponer enfoques distintos a los empleados en la actualidad para su diagnóstico. Restringir el estudio de parásitos a niños con factores de riesgo comprobados o a un curso prolongado e inexplicable de diarrea, puede ahorrarles a los sistemas de salud tanto tiempo como gastos innecesarios. Las estrategias para ayudar a los pediatras a decidir cuándo indicar un estudio de parásitos en heces, incluiría restringir estas pruebas a los pacientes con una indicación clara que genere un alto índice de sospecha, estableciendo criterios clínicos que orientaran cuándo es apropiado la solicitud de estudio de parásitos.

1.3.4 Características de laboratorio y clínicas de los casos

Establecer criterios clínicos que orienten o generen un alto índice de sospecha de etiología parasitaria en niños con diarrea persistente, es básico a la hora de enfocar su estudio. En base a los resultados de este trabajo, se realiza una aproximación a las características clínicas mas importantes.

A. Parásitos con significado clínico bien contrastado

a) Casos de *Giardia* sp

Del análisis de los casos de *Giardia* sp, se dedujeron una serie de aspectos importantes asociados a la detección del parásito.

-Respecto a la edad, se presentaba un agrupamiento en torno a los 4 años (niños relativamente pequeños), con 9 (77%) casos en la franja de edad entre 1 y 5 años. Este aspecto está también contrastado en otro estudio realizado en Sevilla sobre muestras hospitalarias (Coronel et al., 2017) donde la mediana de casos se situaba también en los cuatro años. En España, en otros estudios anteriores, la mayoría de los casos se situaban también en la franja de 1 a 4 años (Carmena et al., 2012).

-Respecto al motivo clínico principal asociado de solicitud del estudio de parásitos, se basó en una sintomatología de diarrea persistente asociada a dolor abdominal en un 46,2% de los casos, este es un aspecto clínico bien contrastado (Robertson et al., 2010; Wolfe, 1992; Hill, 2001), aunque otros estudios indican la existencia de mucha variabilidad individual en la sintomatología debido a la naturaleza intermitente de la diarrea (Jones, 1988). En nuestro estudio la diarrea persistente sin dolor abdominal (23,1% de los casos) y la asociada a hematoquecia (23,1%) también estuvieron presentes y están comunicados en otros estudios (Wolfe, 1984), aunque la hematoquecia es un signo muy poco frecuente y podría tener relación con otras patologías concomitantes.

-En el 85% de los casos de parasitosis por *Giardia* sp de nuestro estudio se detectó la presencia de azúcares reductores o grasas en las heces, esta asociación está bien contrastada en otros estudios que relacionan la malabsorción de azúcares o grasas con la presencia del parásito (Wolfe, 1992; Gillon, 1985; Meyer et al., 1979).

-En 5 pacientes se constató que las heces tenían características inflamatorias, con niveles de calprotectina que oscilaron entre 46 y 233 µg/g, en dos casos asociados a infección concomitante por *Salmonella* sp, en uno asociado a exacerbación de una enfermedad inflamatoria intestinal, en los dos restantes no había datos clínicos complementarios en la historia, pero en uno de ellos estaba asociado a hematoquecia (un signo de alarma de enfermedad inflamatoria intestinal).

Otros aspectos clínicos complementarios tras la revisión de la historia.

Tres niños (23%) presentaban déficit de IgA, dado que la barrera protectora del sistema gastrointestinal se ve afectada en la deficiencia de IgA, los protozoos como *Giardia* pueden adherirse al epitelio, proliferar y causar infección lo que es un aspecto bien conocido (Zinneman et al., 1972). Se constató la existencia de trastornos oculares en el 46,1% de los niños, la clínica generalmente era de dolor ocular asociado a conjuntivitis, esta asociación fue comunicada por Barraquer en 1938 que hacía referencia a la existencia de episodios de iridociclitis, coroiditis y hemorragia retiniana en pacientes de giardiasis (Barraquer, 1938), posteriormente confirmada por distintos estudios que han comunicado una asociación entre la presencia de uveitis y vasculitis retiniana, con la giardiasis (Carrol et al., 1961; Knox et al., 1982). Además, Pettoello et al. (1990) comunicaron la presencia de lesiones degenerativas de la retina (en forma de “sal y pimienta”) en el 8,8% de niños que padecían giardiasis. Posteriormente, Corsi et al. (1998) demostraron afectación retiniana en el 20% de los niños parasitados por *Giardia* sp y la asociaron con títulos altos de inmunocomplejos circulantes (mecanismo de hipersensibilidad tipo III). En nuestro estudio, no existió una evaluación oftalmológica detallada de los casos, pero la catalogación de los trastornos oculares como conjuntivitis (ojo rojo) unida a la presencia de dolor ocular podrían sugerir más la existencia de uveitis que el diagnóstico de conjuntivitis que se realizó.

b) Casos de *Cryptosporidium* sp

Del análisis de los casos de *Cryptosporidium* sp, se dedujeron una serie de aspectos importantes asociados a la detección del parásito.

-Respecto a la edad, se presentaba un agrupamiento en torno a los 7 años, con un 65,2% de los casos en la franja de edad de 7 a 13 años. Estos resultados, no coinciden con otros estudios publicados, donde la mayoría de casos se sitúan por debajo de los 5 años. Así, en otro estudio realizado en Sevilla sobre muestras hospitalarias (Coronel et al., 2017) la mediana de edad de los casos se situaba en los dos años. A nivel europeo, también se comunica una mayor prevalencia entre

los niños menores de 5 años, aspecto que probablemente refleja una mayor exposición al parásito como resultado de una peor higiene, así como una falta parcial de inmunidad (Cacciò et al., 2016). En un estudio sobre el papel de *Cryptosporidium* sp en casos de diarrea persistente, también se indican una mayor incidencia en menores de 2 años respecto a niños de mayor edad (50% vs 38%), pero el estudio incluía niños con antecedentes de viajes y otros sin domicilio fijo, y por tanto no comparable a la población de este estudio (Phillips et al., 1992).

-Respecto al motivo clínico principal asociado de solicitud del estudio de parásitos asociado a los episodios de cryptosporidiasis, se basó en una sintomatología de diarrea persistente asociada a dolor abdominal en un 75% de los casos, seguida por una sintomatología de diarrea persistente asociada a hematoquecia en el 25% de los casos. Esta presentación clínica, coincide con otros estudios europeos donde la diarrea persistente por *Cryptosporidium* sp está asociada a otros síntomas gastrointestinales, principalmente dolor abdominal, siendo la hematoquecia menos común, pero también asociada a los casos de infección (Hunter et al., 2004; Rehn et al., 2015). Lo anterior, contrasta con lo publicado en los estudios de diarrea persistente por *Cryptosporidium* sp en países en desarrollo donde es poco común que la infección curse con dolor abdominal o hematoquecia (Platts-Mills et al., 2015).

-En el 100% de los casos de parasitosis por *Cryptosporidium* sp de nuestro estudio se detectó la presencia de azúcares reductores o grasas en las heces, esta asociación está bien contrastada en otros estudios que relacionan la malabsorción de azúcares o grasas con la presencia del parásito. Estos estudios indican que *Cryptosporidium* sp produce un deterioro de la función de absorción intestinal con un cambio significativo en los niveles de grasas en heces y una disminución de la excreción de D-xilosa que conduce al desarrollo de un síndrome de malabsorción intestinal (Handousa et al., 1991; Barbot et al., 2001).

-En 3 niños se constató que las heces tenían características inflamatorias, con niveles de calprotectina que oscilaron entre 65 y 219 µg/g, no había datos clínicos complementarios en la historia, pero en dos de ellos estaba asociado a hematoquecia (un signo de alarma de enfermedad inflamatoria intestinal). No se constató infección bacteriana concomitante en ninguno de los casos. No está descrita la existencia de una diarrea inflamatoria asociada a la infección por *Cryptosporidium* sp, pero sí su asociación con una enfermedad inflamatoria intestinal (Vadlamudi et al., 2013), además la criptosporidiosis puede diagnosticarse erróneamente como una recaída de la enfermedad inflamatoria y conducir a un tratamiento inapropiado.

-Otros aspectos clínicos complementarios tras la revisión de la historia, en tres niños se constató la existencia de sintomatología extraintestinal, asociada al episodio de diarrea persistente. En tres niños (37,5%) se constató la existencia de dolor de cabeza recurrente, en uno de ellos asociado a dolor ocular. Esta sintomatología extraintestinal, se ha comunicado en otros estudios europeos, donde la sintomatología extraintestinal más frecuente en los casos de infección persistente por *Cryptosporidium* sp es el dolor articular (no constatado en nuestro estudio), seguido del dolor de cabeza y el dolor ocular. El mecanismo inmunológico de afectación ocular, a diferencia de lo que ocurre en la infección por *Giardia* sp, no ha sido estudiado (Hunter et al., 2004; Rehn et al., 2015).

B. Parásitos con significado clínico no bien contrastado

a) Casos de *Blastocystis* sp

Del análisis de los casos de *Blastocystis* sp se dedujeron una serie de aspectos importantes asociados a la detección del parásito.

-Respecto a edad de los casos, la mediana de edad se situó en 7 años, con un agrupamiento la franja de 6 a 9 años, que incluía el 57% de los casos. Este resultado, coincide con otro estudio publicado en Sevilla sobre muestras hospitalarias, donde la mediana de casos se sitúa en los 6-7 años (Coronel et al., 2017). Sin embargo, la relación de *Blastocystis* sp con la edad es controvertida (Stensvold et al., 2016), existen poblaciones con alta prevalencia donde el parásito se detecta a edades muy tempranas, mientras que, en otras poblaciones, particularmente donde la prevalencia general es mas baja, muchos individuos pueden adquirir *Blastocystis* sp a edades mas tardías. Además, no está claro si la edad de la colonización tiene alguna importancia clínica.

-Respecto al motivo clínico principal asociado de solicitud del estudio de parásitos asociado a la presencia de *Blastocystis* sp, se basó en una sintomatología de diarrea persistente asociada a dolor abdominal en un 66,6% de los casos, seguida por una sintomatología de diarrea persistente asociada a hematoquecia en el 23,3% de los casos. Esta sintomatología, coincide con la comunicada en otros estudios donde la infección se ha asociado a signos y síntomas como diarrea, estreñimiento, dolor abdominal, náuseas, anorexia, vómitos, fatiga, flatulencia, distensión abdominal, proctosigmoiditis hemorrágica, urticaria crónica o artritis infecciosa (Tan, 2008; Tan et al., 2010). Sin embargo, el significado clínico de la infección por *Blastocystis* es controvertido y otros estudios han encontrado falta de correlación entre infección y la presentación clínica (Scanlan et al., 2014; Leder et al., 2005).

-En el 16,6% de los casos de parasitosis por *Blastocystis* sp de nuestro estudio se detectó la presencia de azúcares reductores o grasas en las heces. No está descrita la asociación entre la presencia de *Blastocystis* sp y episodios de malabsorción (Behera et al., 2008). Sin embargo, estos casos estaban asociados a celiquía, déficit de IgA o enfermedad inflamatoria intestinal que son causas conocidas de malabsorción de azúcares o grasas, aspecto comunicado en otro estudio (Bálint et

al., 2014) y que podrían justificar estos hallazgos con independencia de la presencia de *Blastocystis* sp.

-En 5 niños se constató que las heces tenían características inflamatorias, con niveles de calprotectina que oscilaron entre 102 y 873 µg/g, en dos de estos casos asociados a infección bacteriana por *Salmonella* sp y *Campylobacter* sp y otro a enfermedad inflamatoria intestinal diagnóstica, además en dos casos mas se asoció a hematoquecia, aspectos que justificarían las características inflamatorias de las heces. No está descrita la existencia de una diarrea inflamatoria asociada a la infección por *Blastocystis* sp, pero sí su asociación con enfermedad inflamatoria intestinal (Cekin et al., 2012).

-Otros aspectos clínicos complementarios tras la revisión de la historia, en dos niños (6,6%) se constató la existencia de sintomatología extra-intestinal, en forma de dolor de ocular y vómitos. La asociación de *Blastocystis* sp y vómitos está descrita en algunos estudios (Tan, 2008), pero no la asociación con dolor ocular.

b) Casos de *Dientamoeba* sp y *Endolimax* sp

La prevalencia en heces de estos parásitos en niños con diarrea persistente fue muy baja, 0,25% para ambos. La edad de los casos de *Dientamoeba* sp fue de 1 y 4 años y para *Endolimax* sp de 9 meses y 5 años.

No existen estudios específicos que relacionen la edad y la presencia de *Dientamoeba* en las heces, pero la baja prevalencia encontrada, es un reflejo de lo publicado en la literatura en los últimos años, donde la prevalencia en *Dientamoeba* en niños con diarrea o clínica gastrointestinal es muy variable, oscilando entre prevalencias muy altas del 32-64% (Bruijnesteijn et al., 2009; Maas et al., 2014) a prevalencias extremadamente bajas o moderadas del 0-2% (Mumcuoglu et al., 2013; Church et al., 2010; Kasseem et al., 2007).

Respecto a las características clínicas de los dos casos, se constató que en ambos el motivo clínico de estudio fue un síndrome de diarrea persistente. Aunque la patogenicidad de *Dientamoeba* sp ha sido debatida durante muchos años (Turner, 1985), la infección crónica está descrita, con una duración media de la diarrea de 1-2 meses, siendo el dolor abdominal la sintomatología asociada más común (Johnson et al., 2004). En uno de los casos la presencia de *Dientamoeba* sp estaba asociada a valores de calprotectina elevados, aunque está descrita la asociación del parásito con enfermedad inflamatoria intestinal, en general se considera que no hay asociación entre colitis activa y la presencia del parásito (Stark et al., 2016).

En el caso de *Endolimax* sp, la baja prevalencia encontrada, no pudo ser contrastada. No existe evidencia de la asociación del parásito con diarrea crónica o persistente en la literatura científica, aunque abundan los trabajos que proporcionan datos sobre la prevalencia en general en encuestas parasitarias. Esto se puede explicar, por la aparición del parásito en estudios que investigan la prevalencia de parásitos intestinales en población general. En base a estos estudios, se considera que la prevalencia en población europea oscila entre el 1,7% en población sana y 5,4% en población con diarrea (Poulsen et al., 2016). Sin embargo, estudios en niños, son más escasos, pero en dos estudios realizados en Sevilla en los últimos años se comunican prevalencias del 1,6% en niños sanos (Pérez et al., 1997) y del 4,2% en niños de atención primaria con diarrea (Coronel et al., 2017).

Respecto a la sintomatología clínica que motivó el estudio de parásitos, uno de los niños presentaba diarrea persistente y dolor abdominal, y otro diarrea persistente asociada a hematoquecia, ambos con niveles de calprotectina elevados y coprocultivo negativo. Lo anterior, es sugestivo de enfermedad inflamatoria intestinal, aunque no había datos en la historia clínica para confirmar la sospecha. De todas formas, en base a los estudios publicados, existe muy poca evidencia a

favor de que *Endolimax* sp deba considerarse un patógeno con capacidad de causar diarrea o inflamación intestinal (Poulsen et al., 2016).

1.3.5 Evaluación de las distintas técnicas microscópicas y moleculares para la detección de parásitos

a) Técnicas microscópicas con y sin concentración

De la comparación del rendimiento de ambas técnicas en nuestro estudio, se constató que la microscopía sin concentración era menos sensible (aproximadamente un 70%) que la microscopía con concentración para la detección de parásitos en niños con diarrea persistente. Este aspecto, coincide con otros estudios (Hailu et al., 2015; Restrepo et al., 2013) que comunican que la carga de parásitos en la muestra y la cantidad de muestra tomada durante el examen comprometen en gran medida la sensibilidad de la microscopía directa. Aunque dada su moderada sensibilidad, la microscopía directa podría considerarse en un primer paso de la evaluación en niños con diarrea persistente, el empleo de un método de concentración es esencial para aumentar las posibilidades de de detección de parásitos, siempre que la técnica esté bien estandarizada (Manser et al., 2016).

b) Técnicas microscópicas vs moleculares

Los resultados de este trabajo demuestran que las técnicas moleculares son en general menos sensibles (sensibilidad aproximadamente del 80%) que la microscopía convencional (concentración de las heces mas tinción de auramina o Kinyoun) para el diagnóstico de la infección parasitaria en niños con diarrea persistente. Al igual que en nuestro trabajo, otros estudios han comunicado un

rendimiento no adecuado de las técnicas moleculares para la detección de parásitos (Uchôa et al., 2018; Laude et al., 2016) y se contraponen a otra serie de estudios que encuentran que las técnicas de PCR en tiempo real proporcionan una sensibilidad adicional sobre la microscopía convencional (Verweij et al., 2011; McHardy et al., 2014). Sin embargo, este estudio es el primero que evalúa el rendimiento de las técnicas moleculares en el estudio de la diarrea persistente en el niño y por tanto sus resultados no son comparables.

Además, estas discrepancias habría que considerarlas también en el contexto del tipo de técnica molecular empleada para el diagnóstico, ya que al igual que en este trabajo, la mayoría de los estudios más recientes están basados en el uso de plataformas diagnósticas comerciales basadas en técnicas de PCR multiplex, sobre todo para protozoos, como alternativa a la microscopía de rutina (Gray et al., 2014; Stark et al., 2014; Ten Hove et al., 2007), y el rendimiento de estas plataformas puede variar mucho entre distintas marcas comerciales (Hartmeyer et al., 2017; Rijsman et al., 2016).

Lo anterior, lleva a que el empleo de técnicas comerciales de PCR multiplex unido al tipo de población estudiada, incluya una serie de variables que afectan al rendimiento y que deberían ser tenidas en cuenta a la hora de valorar sus resultados.

a) Carga parasitaria. La carga de ADN parasitario está muy influenciada por las variaciones diarias en la excrección de parásitos y la distribución no homogénea de los parásitos dentro la muestra, lo que sugiere que se debería prestar una atención especial a la homogeneización de las heces y que es probablemente un paso esencial debido a que la cantidad de heces utilizadas para la extracción de ADN es menor que la necesaria para microscopía (Hawash et al., 2014; Elfving et al., 2014). Por otro lado, la baja carga parasitaria que caracteriza la patogénesis de algunas parasitosis crónicas es un factor determinante en el rendimiento de las técnicas moleculares (Stensvold, 2012; Vanathy et al., 2017). En este trabajo, se ha evaluado

la sensibilidad de la PCR utilizada, lo que ha permitido conocer la carga parasitaria de las muestras estudiadas a partir del ciclo de amplificación, y demuestra que la carga en niños con diarrea persistente es moderada con una mediana de 400-500 parásitos/ μ L y con un 27% de las muestras con cargas bajas de 100-200 parásitos/ μ L estos datos confirman lo anteriormente expuesto.

Todo lo anterior, podría afectar a la extracción del ADN de las muestras. Este es un aspecto determinante de los estudios moleculares, dado que las heces son un material muy complejo, puede producirse una degradación del ADN en la muestra, y la actividad de la polimerasa también puede verse afectada, lo que dificulta la recuperación del material genético del interior de los quistes del parásito (Hawash, 2014).

b) Presencia de inhibidores. La inhibición de la amplificación del ADN parasitario puede conducir a resultados falsos negativos. En general, las técnicas de PCR comerciales incluyen controles internos de amplificación, de forma que cuando se produce la inhibición, el ADN de control tampoco se amplificará. En estos casos, existen procedimientos para retirar los inhibidores y facilitar un nuevo estudio de las muestras (Schrader et al., 2012). Sin embargo, estos procedimientos no son totalmente efectivos y no garantizan un resultado óptimo de los procesos de amplificación a partir de las heces. Al igual que en nuestro estudio, en que nueve muestras fueron repetidamente negativas a pesar de emplear distintas formas de inhibición de la amplificación y de técnicas de PCR, este problema ha sido comunicado en otros trabajos (Marawan et al., 2017) y podría ser una debilidad importante para la utilización de rutina de las técnicas moleculares para el estudio de parásitos en heces.

Por tanto, aunque la PCR en tiempo real puede proporcionar sensibilidad adicional en la detección de parásitos, existe un riesgo de baja eficacia en la extracción o de presencia de inhibidores. En base a esta observación, la PCR en tiempo real sería

de mayor utilidad como una prueba adicional suplementaria a la microscopía (Schuurman et al., 2007).

1.3.6. Evaluación de las técnicas cromatográficas para la detección de giardiasis

Las técnicas cromatográficas discriminaron con una eficacia del 100% los casos de giardiasis de los casos diarreicos sin etiología parasitaria, con lo que se concluye que puede ser un método altamente sensible para el diagnóstico de procesos diarreicos por *Giardia* sp.

La extracción de compuestos volátiles de las heces se realizó empleando el método de extracción de espacio de cabeza estático. Este método está específicamente indicado para el análisis de volátiles mayoritarios en muestras, los cuales se encuentran en alta concentración en las mismas. Como se observa en la tabla 33. Se determinaron un total de 25 compuestos volátiles, de los cuales 7 fueron ésteres, 6 alcoholes, 6 terpenos, 2 compuestos azufrados, una amida, un ácido y un aldehído.

Los ésteres fueron el grupo más numeroso de compuestos volátiles observados. Se encontraron principalmente ésteres de ácidos grasos de cadena corta como acetato, butanoato, pentanoato, hexanoato y heptanoato de metilo, butanoato de etilo y propanoato de etilo que son compuestos que suelen tener un aroma afrutado. Esto coincide con lo encontrado por Bond et al. (2015) los cuales al analizar los compuestos volátiles de heces de pacientes con *Giardia* sp, encontraron los ésteres como grupo mayoritario, sin embargo, no encontraron diferencias significativas con el grupo control.

En nuestro estudio, se encontraron estos compuestos en sólo 2 casos de los 10 pacientes con síndrome diarreico de etiología no parasitaria, y, sin embargo, todos

los pacientes con *Giardia* sp presentaron al menos uno de los ésteres encontrados en el espacio de cabeza de las heces analizadas.

Además, Bond et al. (2015) encontraron diferencias significativas entre la cantidad de propanoato de propilo y butanoato de etilo entre los pacientes con giardiasis y el grupo control, pero, sin embargo, encontraron mayor cantidad de ambos en los pacientes del grupo control, al contrario que en nuestro estudio.

Por otro lado, Garner et al. (2007) demostraron la presencia mayoritaria de los ésteres en las heces de pacientes con síndrome de intestino irritable. Esta aumentada presencia de los ésteres puede ser debida a su síntesis a partir de ácidos grasos de cadena corta como sustratos a través de la enzima Acyl CoA ya que en diversas enfermedades intestinales ha sido descrita una mayor presencia de ácidos grasos de cadena corta (Di Cagno et al., 2009; Del Chierico et al., 2017; Garner et al., 2007).

			PACIENTES SIN PRESENCIA DE GIARDIA									PACIENTES CON PRESENCIA DE GIARDIA								
			PD	PD	PD	PD	PD	PD	PD	PD	PD	PD1	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	
LR	I	Ésteres	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	
782	A	Acetato de metilo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	134	-	747	493	-	
998	A	Butanoato de metilo	-	-	-	-	-	340	-	-	-	-	-	63	268	641	497	343	-	
100	A	Butanoato de etilo	-	-	-	-	-	40	-	-	-	-	-	-	106	-	-	-	-	
110	A	Pentanoato de metilo	-	-	-	-	-	151	-	15	-	-	-	-	-	227	920	653	64	
107	A	Butanoato de propilo	-	-	-	-	-	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
120	A	Hexanoato de metilo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28	-	-	-	94	107	
130	A	Heptanoato de metilo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	-	-	-	-	-	
Alcoholes																				
961	B	1,3-dimetoxi-2-Propanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	725	561	-	326	939	579	110
102	A	Propanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	239	
109	A	Isobutanol	-	-	-	-	-	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
113	A	Butanol	-	-	-	14	-	90	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
124	A	Pentanol	-	-	-	-	-	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
128	B	1,4-dimethoxy-2,3-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	113	55	23	44	94	54	69
162	A	p-cresol	-	90	68	-	103	-	-	40	-	32	-	-	-	-	-	-	-	
Compuestos azufrados																				
106	A	Disulfuro de dimetilo	333	59	99	120	47	389	38	355	18	470	-	-	-	-	-	-	-	
136	A	Trisulfuro de dimetilo	147	-	-	19	-	45	-	15	-	19	-	-	-	-	-	-	-	
Terpenos																				
106	B	β -terpineno	-	-	-	127	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
107	B	β -felandreno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-	-	-	-	-	
111	A	β -pineno	-	23	173	16	-	-	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-	75	
112	A	δ -limoneno	207	61	-	20	-	-	-	-	32	-	-	9	-	22	9	-	65	
113	A	δ -3-careno	-	18	-	91	-	-	-	-	39	12	-	-	-	-	-	-	78	
126	A	p-cymene	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ácidos																				
145	A	Ácido acético	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	376	213	89	139	143	111	309
Misceláneo																				
905	A	2-hidroxiopropanamida	-	-	-	315	-	-	-	-	-	-	250	427	280	534	335	279	879	
108	A	Hexanal	-	-	-	-	-	-	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

A: compuestos identificados por el software y bibliografía.

B: compuestos identificados por el software. (kovats no encontrados en bibliografía).

Tabla 33. Determinación de compuestos volátiles en las muestras analizadas por Espacio de cabeza estático de heces de los pacientes con presencia de *Giardia* sp (PG) y paciente sin *Giardia* sp pero con proceso diarreico (PD).

Por otro lado, se encontraron 2 compuestos azufrados, el disulfuro de dimetilo y el trisulfuro de dimetilo, siendo su descripción aromática: cebolla, repollo cocido/podrido y azufre/pescado/repollo cocido respectivamente. Estos compuestos se encontraron en el espacio de cabeza de todas las muestras analizadas de heces pertenecientes a los pacientes con proceso diarreico sin etiología parasitaria y no fue hallado en ninguna de las muestras de los pacientes con giardiasis.

Estos volátiles suelen aparecer en heces de manera común y se les atribuye el olor característico de las heces (Moore et al., 1987; Suarez et al., 1998). Ambos proceden del metabolismo de metionina por parte de diversos microorganismos presentes en la flora intestinal, ya que este aminoácido es el precursor para su formación (Kadota e Ishida, 1972).

El siguiente diagrama ilustra la degradación de la metionina (Clanton y Schmidt, 2000):



Metionina + agua mercaptano de metilo + amoniaco + cetobutirato



mercaptano de metilo + agua metanol + sulfuro de hidrógeno

El disulfuro de dimetilo y trisulfuro de dimetilo se forman por oxidación del mercaptano de metilo y en el caso del trisulfuro de dimetilo también por oxidación del sulfuro de hidrógeno (Zahn et al., 2001).

Estos compuestos azufrados han sido descritos por otros autores como biomarcadores en enfermedades diversas como carcinoma colorrectal, infección por *Campylobacter jejuni*, o cólera (Batty et al., 2015; Garner et al., 2007, 2009).

Sin embargo, para la síntesis de metionina por parte del microorganismo, es necesaria la presencia de la L-Cisteína, y este aminoácido ha sido descrito como imprescindible para la supervivencia de *Giardia* sp (Luján y Nash, 1994).

Por tanto, podría ser posible que, en el caso de los pacientes con procesos diarreico de etiología no parasitaria, estos compuestos se estén produciendo en grandes cantidades de manera normal como ocurre en las heces por parte de la microbiota intestinal.

Sin embargo, en el caso de los pacientes con giardiasis, la formación de estos compuestos puede verse impedida por la alta demanda por su precursor (L-cisteína) por parte del parásito. En base a esto, se justificaría la presencia de cantidades menores de disulfuro de dimetilo y disulfuro de trimetilo en las heces de los pacientes con giardiasis, provocando que no pudieran ser detectables con la muestra tomada del espacio de cabeza.

Por tanto, la ausencia de estos compuestos en el espacio de cabeza de muestras de heces podría ser un indicador de presencia de *Giardia* sp o de otro microorganismo cuyo metabolismo sea dependiente de manera estricta del aminoácido cisteína.

Esto coincide de manera parcial con lo observado por Bond et al. (2015), los cuales al extraer por el método de microextracción en fase sólida los compuestos volátiles del espacio de cabeza de heces de pacientes con y sin giardiasis, encontraron que el disulfuro de trimetilo efectivamente se encontraba en menor cantidad en los pacientes con el parásito. Sin embargo, estas diferencias fueron relativamente pequeñas y además no señalaban diferencias con respecto al disulfuro de dimetilo.

Con respecto al grupo de los alcoholes se observaron tendencias interesantes de dos alcoholes. El primero de ellos, el 1,3-dimetoxi-2-propanol, sólo apareció en los pacientes con giardiasis, en concreto, en 6 de los 7 pacientes diagnosticados. Y el segundo, el 1,4-dimetoxi-2,3-Butanediol, apareció igualmente solo en los pacientes con giardiasis, en este caso, en el 100% de los pacientes. Estos compuestos, podrían estar ejerciendo una acción parecida a algunos alcoholes alifáticos de cadena larga que ejercen un efecto inhibitor del crecimiento de otros microorganismos creando un nicho ecológico a *Giardia* sp (Elgaali et al., 2002).

Existe poca base bibliográfica sobre la presencia de estos dos compuestos y *Giardia* sp, además de no haber sido descritos nunca en heces. Ante la ausencia de trabajos de estudio de los compuestos volátiles en *Giardia* sp a excepción del trabajo de Bond et al. (2015) podría indicar la posibilidad de ser estos dos compuestos producto del metabolismo particular de este parásito.

En relación al 1,4-dimetoxi-2,3-Butanediol existe sólo una referencia bibliográfica clara que señala este compuesto como posible marcador de cáncer de mama en muestras analizadas de exhalación de pacientes con la enfermedad diagnosticada vs. pacientes control (Wang et al., 2014). En este trabajo atribuyen la aparición de este alcohol al estrés oxidativo (Knight, J. A., 1998).

Referente al grupo de los compuestos terpénicos no se observaron tendencias destacables. Son compuestos que en la mayoría de matrices suelen tener un aporte importante al aroma global, ya que su umbral de percepción es muy bajo y son responsables de las notas cítricas y verdes. Sin embargo, en las heces el resto de compuestos volátiles presentes no permiten a los compuestos terpénicos expresarse. Varios de los compuestos terpénicos encontrados en este estudio han sido observados en heces de pacientes con colitis ulcerosa, y con infecciones de *Campylobacter jejuni* y *Clostridium difficile* (Garner et al., 2007). Además, en algunas enfermedades como la infección por *Campylobacter jejuni*, los terpenos han sido destacados como posibles biomarcadores (Probert et al., 2004).

A pesar de que los compuestos ácidos son comunes de encontrar en las heces, en este estudio se encontró únicamente ácido acético en el espacio de cabeza de las muestras analizadas. Concretamente, sólo se detectó en las muestras de heces de todos los pacientes diagnosticados con giardiasis y en ninguno de los pacientes control. Los ácidos grasos de cadena corta como el acético suelen ser producto del metabolismo de carbohidratos no digeribles como la fibra, proteínas, péptidos por parte de bacterias colónicas (Backhed et al., 2005). La cantidad de ácidos grasos de cadena corta presente en las heces puede ser un indicativo en ciertas enfermedades relacionadas con el tracto intestinal. Si se encuentran en altas cantidades pueden indicar enfermedad celíaca, enfermedad de hígado graso no alcohólica, infección con *Clostridium difficile* (Di Carlo et al., 2009; Del Chierico et al. 2017; Garner et al., 2007). Nuestros resultados coinciden con los hallados por (Bond et al., 2015), quienes recientemente describieron como un posible marcador de la infección con *Giardia* sp al ácido acético. (Bond et al., 2015) analizaron los compuestos volátiles del espacio de cabeza de heces de 16 pacientes con *Giardia* sp y 17 controles, y en 12 de los infectados encontraron este volátil y en los no infectados únicamente en uno. Así la presencia de ácido acético podría ser in biomarcador de la presencia de este parásito en el hospedador.

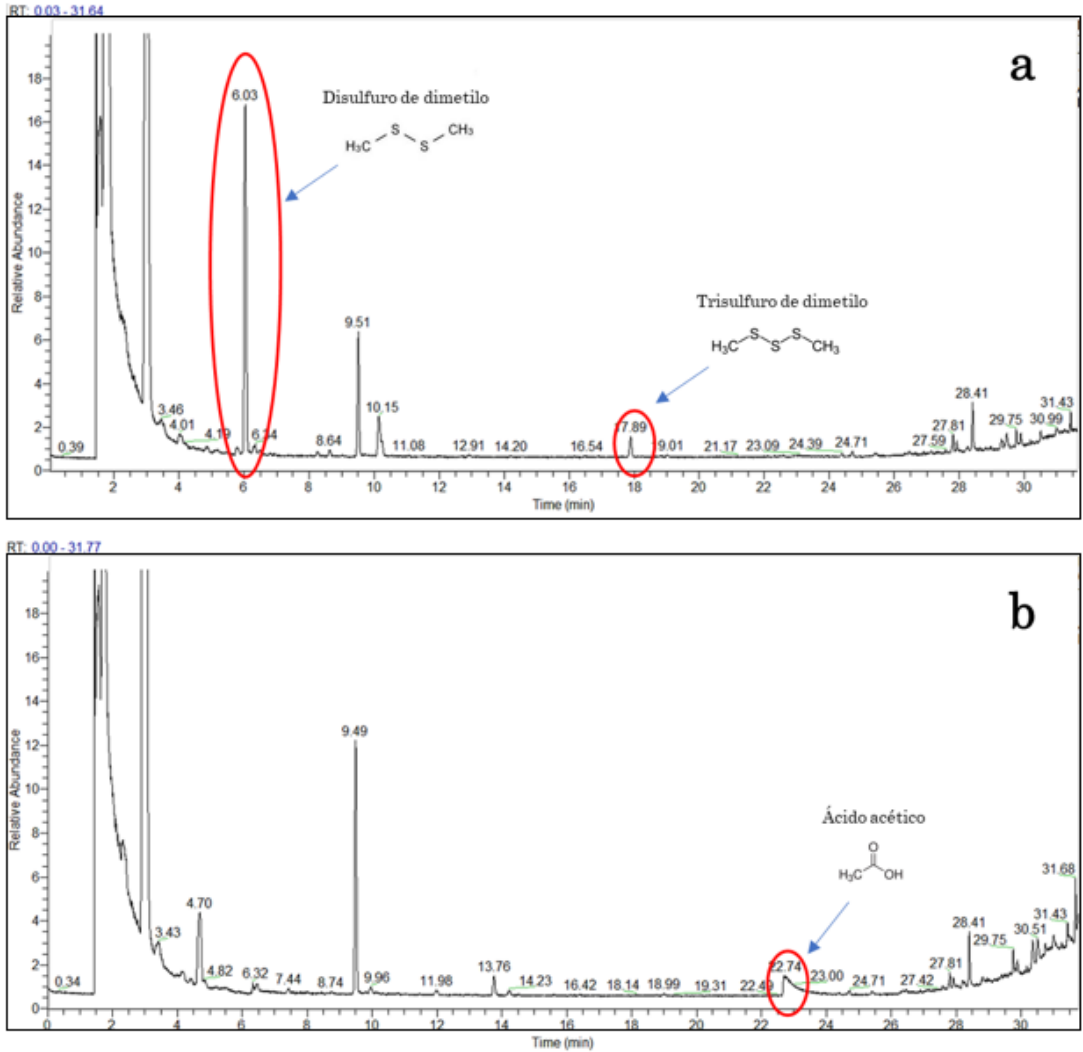


Figura 14. Cromatogramas pertenecientes a pacientes sin giardiasis (a) y a pacientes con giardiasis (b).

Otro compuesto volátil remarcable sería el p-cresol (4-metilfenol). Este compuesto es un fenol volátil que es tóxico para el ser humano, de hecho, es un biomarcador para la evaluación de la salud del intestino delgado en humanos (Birkett et al., 1996; Muir et al., 2004; De Preter et al., 2006). En este estudio, este compuesto sólo

se encontró en las heces de los pacientes con procesos diarreicos de etiología no parasitaria, en concreto en la mitad de las muestras analizadas. Este fenol, ha sido descrito como biomarcador en heces por ejemplo en la infección por *Clostridium difficile* (Tait et al., 2014).

Debido a la cantidad de datos generados a lo largo de este estudio, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) utilizando todos los compuestos volátiles y la suma total de cada grupo químico (30 variables), para permitir una reducción de la dimensión y lograr una mejor comprensión del conjunto obtenido de los resultados. La Figura 15 la distribución de las muestras analizadas representadas para CP1 y CP2, que representaron el 27,8% y el 14,4% de la varianza, respectivamente (422% de la varianza acumulada).

Además, la Figura 16 muestra los valores para las variables y cómo se relacionan con las muestras. Se puede observar cómo la CP1 parece separar a las muestras de heces en función de la presencia de infección por *Giardia* sp.

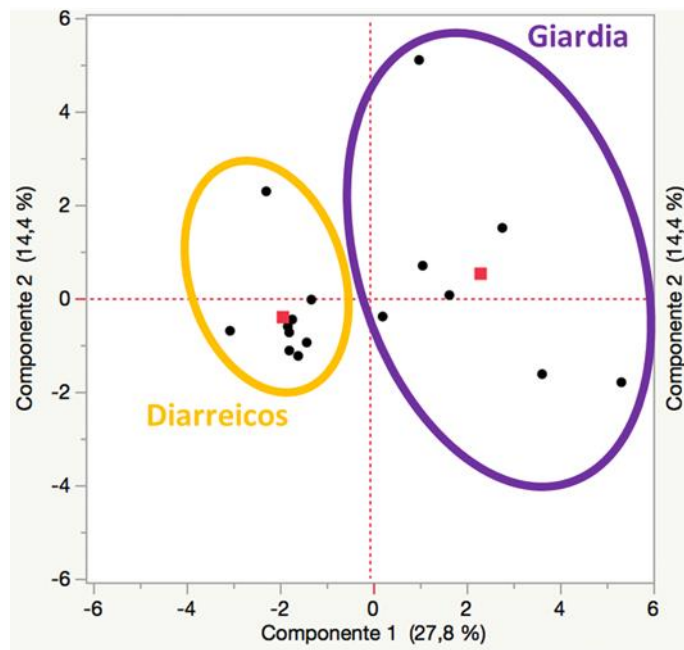


Figura 15. Distribución de las muestras analizadas representadas para CP1 y CP2.

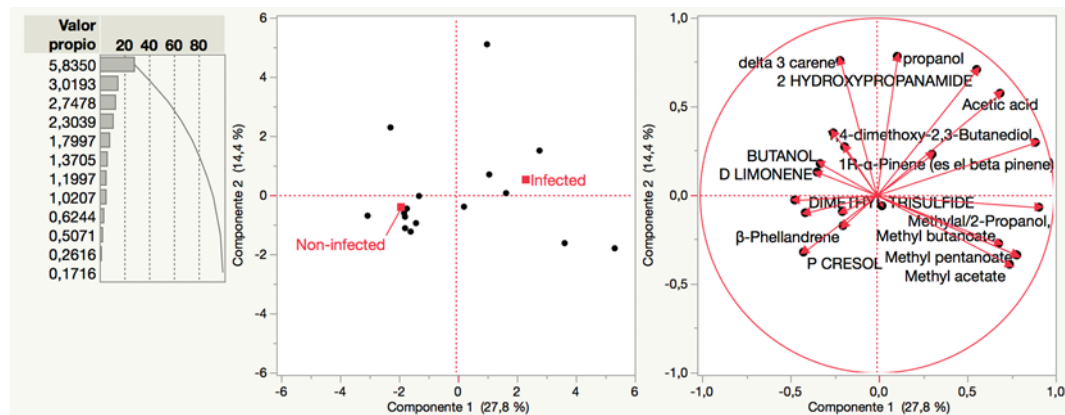


Figura 16. Distribución de los valores y su relación con las muestras.

2. Estudio de la etiología de causa no infecciosa

2.1 Estudio microscópico para la detección de leucocitos fecales

La presencia de leucocitos fecales se constató en 62 muestras, un 7,9% del total en estudio, de ellas 2,8% con escasos leucocitos (<5 leucocitos x40), 3,3% con moderados (5 a 10 leucocitos x40) y 1,8% con abundantes leucocitos.

La relación entre el motivo de petición y la presencia de leucocitos en heces, fue la siguiente: en 15 el motivo fue diarrea persistente, en 31 diarrea persistente y dolor abdominal, en 14 diarrea persistente y hematoquecia y, en 1 caso diarrea persistente y fiebre y diarrea persistente y vómitos respectivamente, en tabla 7 se puede observar detalladamente estos resultados.

Leucocitos	Motivo petición	Número de pacientes
<5	Diarrea persistente	4
	Diarrea persistente y dolor abdominal	11
	Diarrea persistente y hematoquecia	7
Total <5		22
>10	Diarrea persistente	4
	Diarrea persistente y dolor abdominal	8
	Diarrea persistente y hematoquecia	2
Total >10		14
5 a 10	Diarrea persistente	7
	Diarrea persistente y dolor abdominal	12
	Diarrea persistente y fiebre	1
	Diarrea persistente y hematoquecia	5
	Diarrea persistente y vómitos	1
Total 5 a 10		26
Total		62

Tabla 34. Distribución de las muestras en función del motivo de la petición y la presencia de leucocitos fecales.

La presencia de leucocitos fue asociada a enfermedad inflamatoria intestinal en 4 casos (6,4%), celiacía en 2 casos (3,2%) y a diarrea bacteriana en 31 casos (50%).

De los pacientes con presencia de parásitos, en un 22,5% (14/53) de las muestras que presentaban leucocitos fecales, Tabla 8.

Leucocitos	Parásitos	Número de pacientes
<5	<i>Blastocystis</i> sp	1
	<i>Cryptosporidium</i> sp	4
	<i>Giardia</i> sp	3
Total <5		8
>10	<i>Blastocystis</i> sp	1
Total >10		1
5 a 10	<i>Blastocystis</i> sp	3
	<i>Endolimax</i> sp	1
	<i>Giardia</i> sp	1
Total 5 a 10		5
Total		14

Tabla 35. Distribución de las muestras positivas a parásitos y leucocitos fecales.

La asociación de parásitos en heces y leucocitos fecales, estuvo relacionada con enfermedad inflamatoria intestinal en 2 casos y a diarrea bacteriana en 4 casos (*Salmonella* sp, *Campylobacter* sp). En 8 pacientes no se objetivó la causa en el momento del estudio, pero 7 casos presentaban hematoquecia.

Del análisis de los datos, se constata que el 5,1% de las muestras presentaban niveles valorables (moderados o altos) de leucocitos en las heces, mientras que niveles bajos aparecían en el 2,8% de las muestras. Estos procesos inflamatorios estaban relacionados en un 50% con infección bacteriana, enfermedad inflamatoria intestinal en el 6,4% y celiaquía en el 3,2%; aspecto bien reseñado por Harris et al. (1972) que indica que el examen de las heces en busca de leucocitos es un procedimiento rápido y confiable para el diagnóstico precoz de la causa de la diarrea, sobre todo de origen bacteriano. Sin embargo, otros estudios demuestran que la detección de leucocitos en heces tiene un bajo rendimiento para la

diferenciación entre gastroenteritis infecciosa y no infecciosa (Savola et al., 2001; Granville et al., 2004).

En el caso de la relación de la enfermedad parasitaria con la presencia de leucocitos en heces, nuestro estudio detectó la presencia de parásitos en el 22,5% de las muestras con leucocitos fecales, pero asociada a su vez a enfermedad inflamatoria intestinal o hematoquecia (un marcador clínico de enfermedad inflamatoria intestinal) o a diarrea bacteriana. Por tanto, per se, no parece que la diarrea persistente de origen parasitario esté asociada a la presencia de leucocitos fecales (Mercado et al., 2011). Aunque, su poder discriminatorio es bajo cuando la enfermedad parasitaria coexiste con procesos bacterianos o autoinmunes (Huicho et al., 1996; Huicho et al., 1997).

2.2 Estudio bioquímico: determinación de cuerpos reductores en heces

Se detectaron cuerpos reductores en heces en el 5,2 % de las muestras (39/777), en la tabla 9 se puede ver el detalle de los resultados. De ellas, en 20 (51%) correspondían a muestras en la que se detectaron parásitos. De las 19 muestras (49%) en que no se detectaron parásitos, estudios posteriores (no incluidos en este estudio) diagnosticaron 13 casos de intolerancia a la lactosa y 3 casos de celiaquía, uno de los cuales coexistía con la presencia de *Cryptosporidium* sp en las heces.

Cuerpos reductores	Número de pacientes	Porcentaje
0,25%	13	1,7%
0,50%	4	0,5%
1%	4	0,6%
2%	5	0,6%
Negativo	750	97%
Total	777	100%

Tabla 36. Distribución de las muestras en función del resultado en la prueba de cuerpos reductores en heces.

2.3 Estudio bioquímico: estudio de malabsorción de grasas en heces

Se constató malabsorción de grasas (>100 gotas) en el 1,2% de las pacientes (9/777), aunque en el 4,4% (34/777) de los pacientes se constató la presencia de gotas de grasa a niveles más bajos, en la tabla 10 se puede ver el detalle de los resultados. De ellas, en 7 (16,3%) correspondían a muestras en la que se detectaron parásitos en su mayoría *Cryptosporidium* sp (6) y en una *Giardia* sp y con un nivel de excreción bajo, <100 gotas en todos los casos. De las 36 muestras (83,7%) en que no se detectaron parásitos, estudios posteriores (no incluidos en este estudio) diagnosticaron 3 casos de celiaquía y uno de enfermedad inflamatoria intestinal.

Número de gotas de grasa	Número de pacientes	Porcentaje
>100 gotas	9	1,2%
<100 gotas	28	3,6%
Negativo	740	95,2%
Total	777	100%

Tabla 37. Distribución de las muestras en función del resultado del estudio de grasas en heces.

2.4 Estudio bioquímico: estudio de fibras musculares y almidón en heces

Se observaron gránulos de almidón en 1,8% (14/777) de las muestras y fibras musculares en el 0,9% (7/777) de las muestras y en gran parte asociadas a gotas de grasa.

2.5 Procesos de malabsorción o maladigestión

La malabsorción ocurre cuando hay un defecto de transporte primario sin cambios morfológicos o un defecto de transporte secundario debido a cambios morfológicos; cuando se reduce el área de absorción o se afecta el transporte de nutrientes absorbidos desde el intestino. La maladigestión se debe a la reducción de la hidrólisis de nutrientes. Estos dos términos se usan indistintamente y es difícil separarlos en el caso de la enfermedad parasitaria. Los síndromes de malabsorción en el niño abarcan distintas entidades clínicas que producen diarrea crónica persistente, distensión abdominal y retraso del crecimiento. La malabsorción clínica se puede dividir en diferentes causas, tanto congénitas como adquiridas (entre las que se encuentran la infección parasitaria), que afectan uno o más de los diferentes pasos en la hidrólisis intestinal y el posterior transporte de nutrientes.

Carbohidratos

El término malabsorción de carbohidratos se utiliza para describir las situaciones en las que los carbohidratos escapan de la digestión y/o absorción en el intestino delgado y alcanzan el colon. Lo anterior, se pone de manifiesto por la presencia de sustancias reductoras en las heces, que indican que los carbohidratos no se han absorbido adecuadamente.

El aumento de las sustancias reductoras en las heces concuerda con la deficiencia de disacaridasas primarias o secundarias, pero no es diagnóstica (principalmente de deficiencia de lactasa) o la malabsorción de monosacáridos intestinales. Estos

procesos pueden ser congénitos o adquiridos (la más común intolerancia a la lactosa), típicamente secundarios a un daño de la mucosa, como una enteritis viral, infección bacteriana, o afecciones que causan atrofia de la mucosa, como la enfermedad celíaca o la infección parasitaria (Hammer et al., 2012).

En este estudio, en la prueba de cribado, se detectó sustancias reductoras en las heces de 39 (5,2%) de los pacientes. De ellas, 20 (51%) correspondían a pacientes en los que se detectaron parásitos: 11 con presencia de *Giardia* sp, 5 *Blastocystis* sp y 4 *Cryptosporidium* sp. Cabe destacar que en su mayoría (16/20) eran valores que se consideran trazas (0,25%) y en 4 restantes los valores eran iguales o superiores a 0,5% que indicaban claramente que los carbohidratos no eran adecuadamente absorbidos, 3 correspondían a *Blastocystis* sp y 1 a *Giardia* sp. Estos resultados coinciden con otros estudios publicados que ponen de manifiesto la importancia de la malabsorción de carbohidratos en la diarrea persistente por protozoos (Lee, 1984). Distintos estudios usando modelos in vivo e in vitro establecen que *Giardia* sp y *Cryptosporidium* sp causan malabsorción de glucosa, sodio y agua, y reducen la actividad disacaridasa, debido a la pérdida del área epitelial con capacidad de absorción (Bartelt et al., 2015; Coutinho et al., 2008; Gookin et al., 2002).

Respecto a *Blastocystis* sp, su papel como causa de malabsorción es controvertido, aunque está descrita su asociación con intolerancia a los carbohidratos (Eroglu et al., 2009; Boorom et al., 2008). En nuestro caso, existía malabsorción de carbohidratos en el 17% (5/30) de los pacientes en que se detectó *Blastocystis* sp, coincidiendo con otro estudio que no observó asociación estadísticamente significativa entre la presencia de *Blastocystis* sp y la presencia de diarrea debido al alto número de portadores asintomáticos (Martín-Sánchez et al., 1992), aunque en ocasiones podría ser responsable de los episodios de diarrea.

El resto, 19 (49%) pacientes, no mostraron parásitos en heces y estudios posteriores demostraron la presencia de intolerancia a la lactosa en 13 y enfermedad celíaca

en 3, circunstancia bien contrastada en la literatura donde se indican que ambas son las causas no infecciosas más comunes de malabsorción de carbohidratos en el niño (Prieto et al., 2014).

Grasas

En general, la digestión y la absorción de los lípidos se pueden dividir en estados luminales, mucosales y postabsortivos. La fase luminal se caracteriza por la hidrólisis y solubilidad de las grasas y en la fase de la mucosa, los productos digeridos se transportan eficientemente a través de la membrana del borde en cepillo de las células epiteliales intestinales, cuando estos mecanismos están alterados pueden aparecer grasas en las heces en mayor o menor concentración (Feldman, 2010). Lo anterior, ocasiona que las heces aparezcan de color pálido, voluminosas y grasas. En este estudio, 7 (16,3%) correspondían a muestras en la que se detectaron parásitos en su mayoría *Cryptosporidium* sp y en una *Giardia* sp en todos con un nivel de excreción bajo <100 gotas en todos los casos.

Aunque la presencia de grasas en heces está descrita en ambos parásitos, es mucho más frecuente en *Cryptosporidium* sp y a diferencia de *Giardia* sp que causa enfermedad sin penetrar en el epitelio, *Cryptosporidium* sp tiene un ciclo que incluye un estado intra-enterocítico (Juraneck, 1995; Handousa et al., 1991).

El resto, 36 (83,7%) pacientes, no mostraron parásitos en heces y estudios posteriores demostraron la presencia de enfermedad celíaca en 3 y de enfermedad inflamatoria en uno, circunstancias bien contrastadas en la literatura donde se indican que ambas son las causas no infecciosas más comunes de esteatorrea en el niño.

2.6 Relación entre los procesos de malabsorción y mala digestión con la presencia de parásitos en las heces

En el 45,5% (25/55) de los pacientes en los que se detectaron parásitos en las heces se constató la presencia de cuerpos reductores o de grasas en heces. La presencia de cuerpos reductores se detectó en 11 pacientes con *Giardia* sp, 4 con *Cryptosporidium* sp y 5 con *Blastocystis* sp. En el caso de las grasas, en 6 pacientes con *Cryptosporidium* sp y 1 con *Giardia* sp. En la tabla 11 se puede ver el detalle de los resultados.

Parásitos	Determinación de cuerpos reductores	Estudio de principios inmediatos	Número de pacientes
<i>Blastocystis</i> sp	0,25%	Negativo	2
	0,50%	Negativo	2
	1%	Negativo	1
	Negativo	Negativo	25
<i>Cryptosporidium</i> sp	0,25%	<100 gotas	2
	0,25%	Negativo	2
	Negativo	<100 gotas	4
<i>Dientamoeba</i> sp	Negativo	Negativo	2
<i>Endolimax</i> sp	Negativo	Gránulos de almidón	1
	Negativo	Negativo	1
<i>Giardia</i> sp	0,25%	<100 gotas	1
	0,25%	Negativo	9
	0,50%	Negativo	1
	Negativo	Negativo	1
<i>Giardia</i> sp y <i>Blastocystis</i> sp	Negativo	Negativo	1
Total			55

Tabla 38. Distribución de las muestras positivas a parásitos en función de los procesos de malabsorción y maladigestión.

En general, estos resultados, demuestran la importancia del diagnóstico de la infección parasitaria en niños con síndrome de malabsorción y los resultados de este estudio concuerdan con otros publicados donde se demuestra una importante

asociación entre ambas entidades (Brasitus, 1983; Brasitus, 1979; Aubry, 1983), además estudios más recientes comunican que más del 80% de los niños con síndrome de malabsorción estaban infectados por parásitos considerados patógenos o no patógenos como *Endolimax nana* o *Blastocystis* sp (Behera et al., 2008).

2.7 Estudio bioquímico: determinación de calprotectina fecal

El estudio detectó valores de calprotectina superiores a 50 µg/g en las heces de 120 niños con diarrea persistente, 15,4% de los casos. La mediana de los valores de calprotectina, en el total de la población estudiada fue de 12 µg/g (Q1=<10; mediana=12; Q3=34; mínimo=<10; máximo=873).

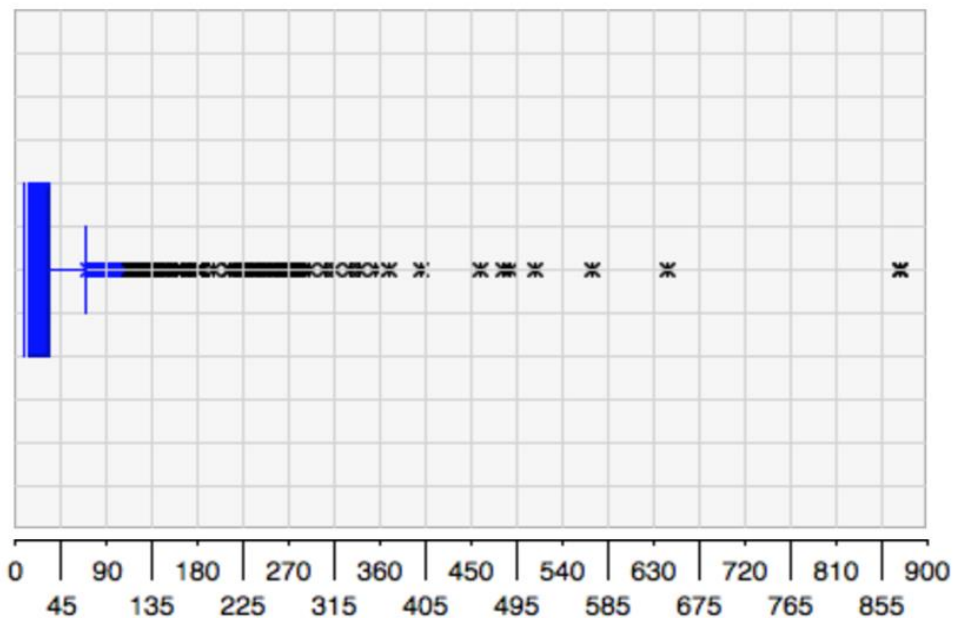


Figura 17. Valores de calprotectina en el total de la población estudiada.

El análisis estratificado en función de la edad, presentación clínica y resultados de laboratorio, fue el siguiente:

En el grupo de menores de 1 año, la mediana fue de 227 $\mu\text{g/g}$ ($Q_1=174$; mediana=227 mcg/g ; $Q_3=257$; mínimo=114; máximo=369).

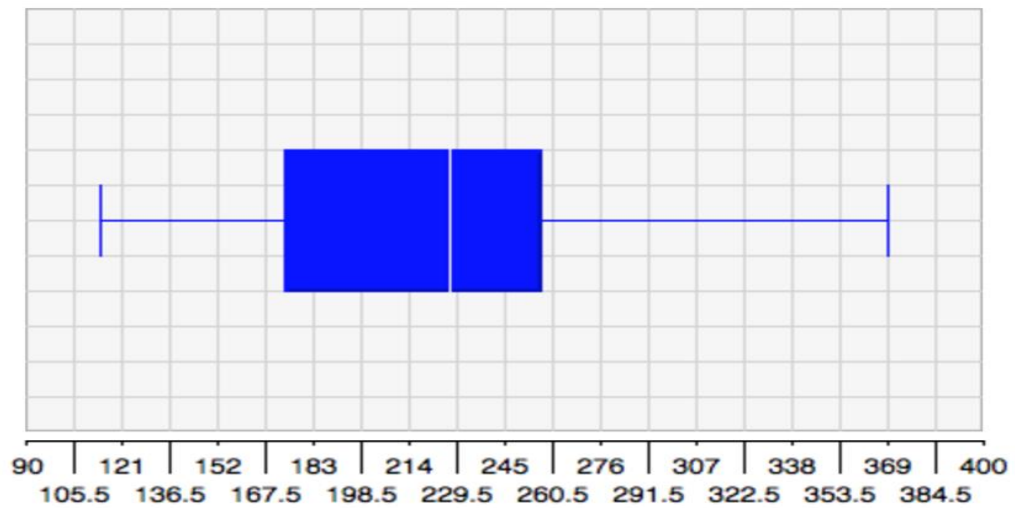


Figura 18. Valores de calprotectina en el grupo de menores de 1 año.

En el grupo de 1 a 4 años, la mediana fue de 24 $\mu\text{g/g}$ ($Q_1=<10$; mediana=24; $Q_3=39$; mínimo=<10; máximo=873).

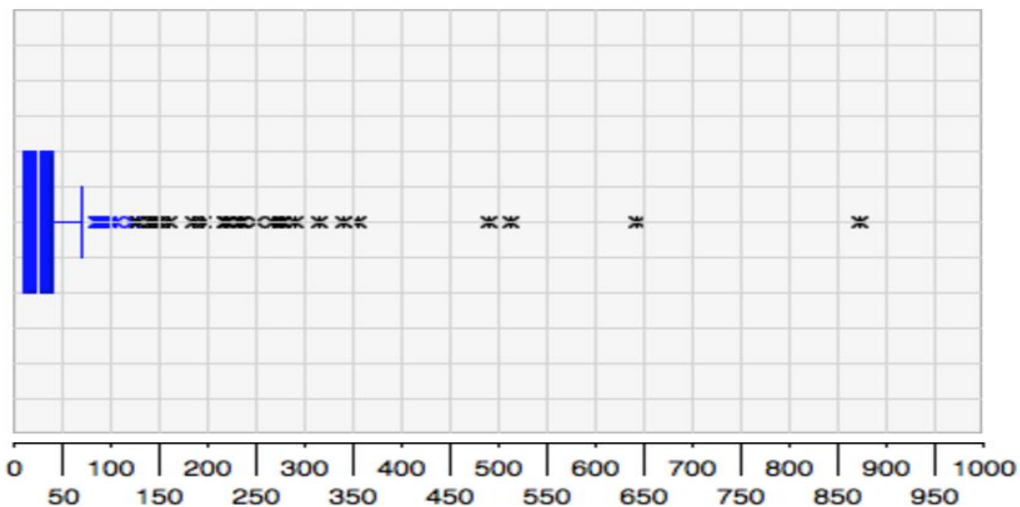


Figura 19. Valores de calprotectina en el grupo de 1 a 4 años.

En el grupo de 5 a 14 años, la mediana fue de <10 $\mu\text{g/g}$ ($Q1=<10$; mediana= <10 ; $Q3=24$; mínimo= <10 ; máximo=865).

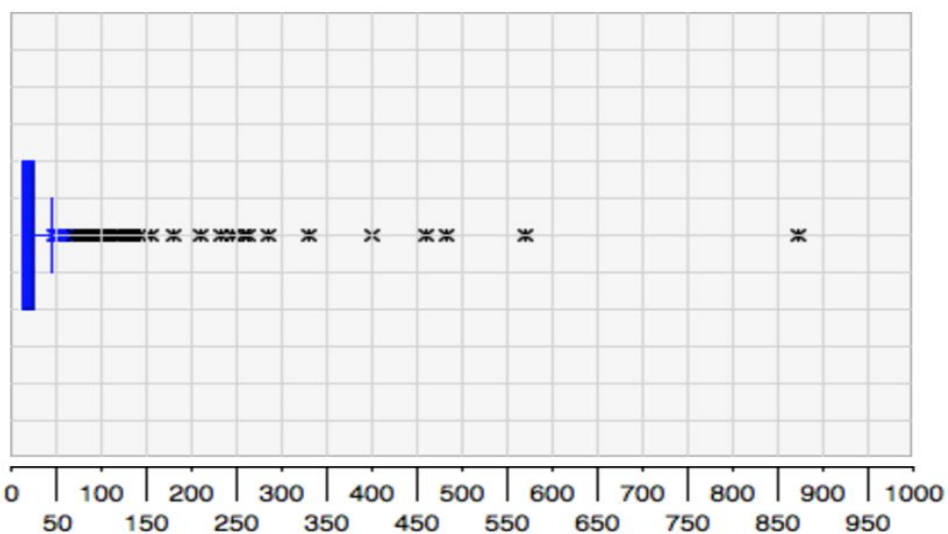


Figura 20. Valores de calprotectina en el grupo de 5 a 14 años.

En el grupo de niños con diarrea persistente en general, la mediana fue menor de 10 $\mu\text{g/g}$ ($Q1=<10$; mediana= <10 ; $Q3=23$; mínimo= <10 ; máximo=643).

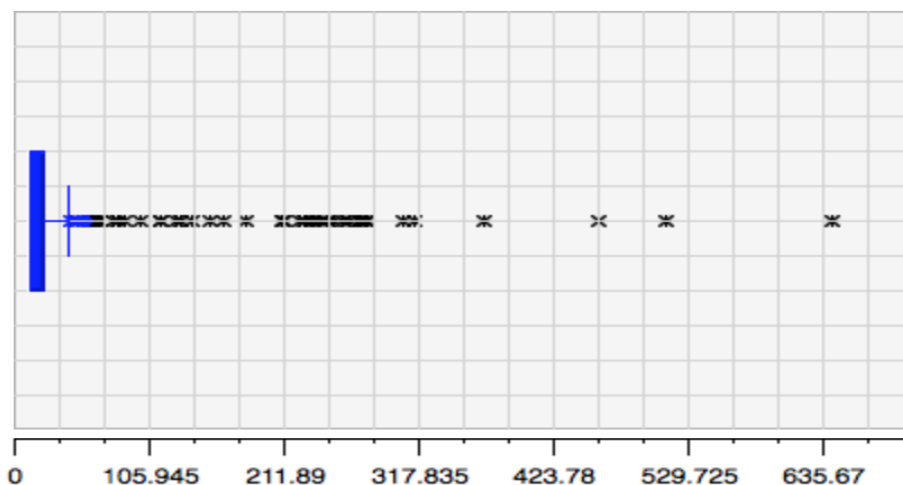


Figura 21. Valores de calprotectina en el grupo de niños con diarrea persistente.

En el grupo de niños con diarrea persistente más dolor abdominal, la mediana fue de 22 $\mu\text{g/g}$ ($Q1 < 10$; mediana=22; $Q3=37$; mínimo= <10 ; máximo=873).

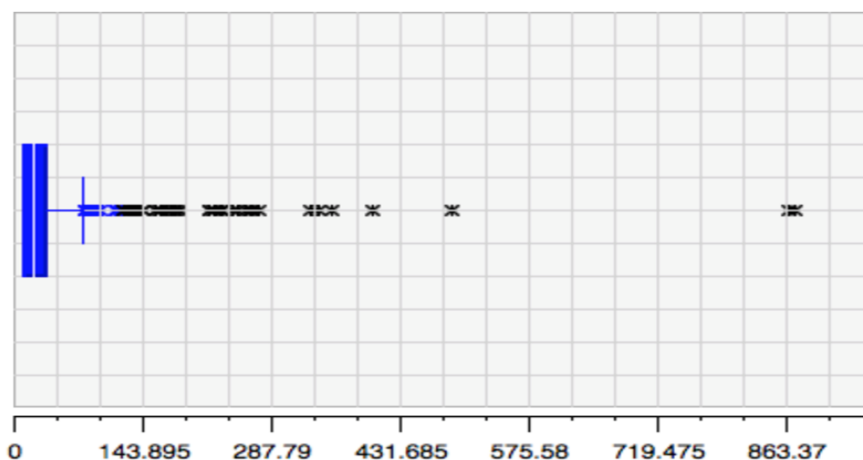


Figura 22. Valores de calprotectina en el grupo de niños con diarrea persistente más dolor abdominal.

En el grupo de niños con diarrea persistente más hematoquecia, la mediana fue de 118,5 $\mu\text{g/g}$ ($Q1=95$; mediana=118,5; $Q3=37$; mínimo=65; máximo=570).

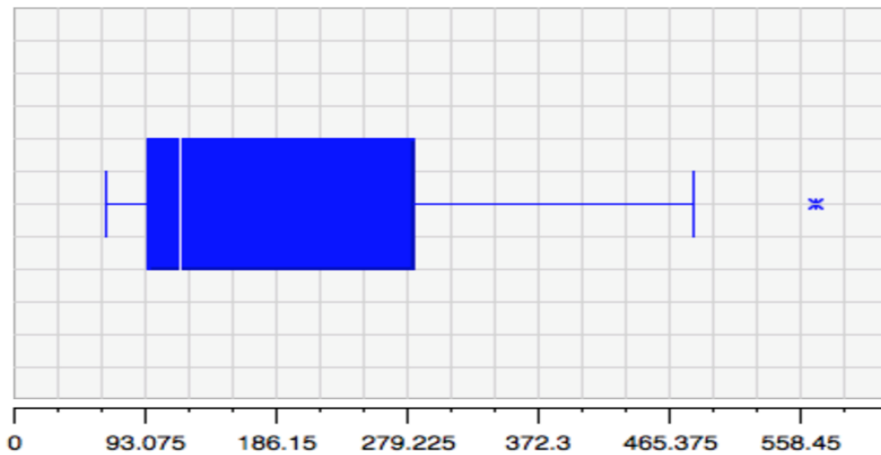


Figura 23. Valores de calprotectina en el grupo de niños con diarrea persistente más hematoquecia.

En el grupo de niños con malabsorción de azúcares y/o grasas, la mediana fue de 33 $\mu\text{g/g}$ (Q1=<10; mediana=33; Q3=59; mínimo=<10; máximo=873).

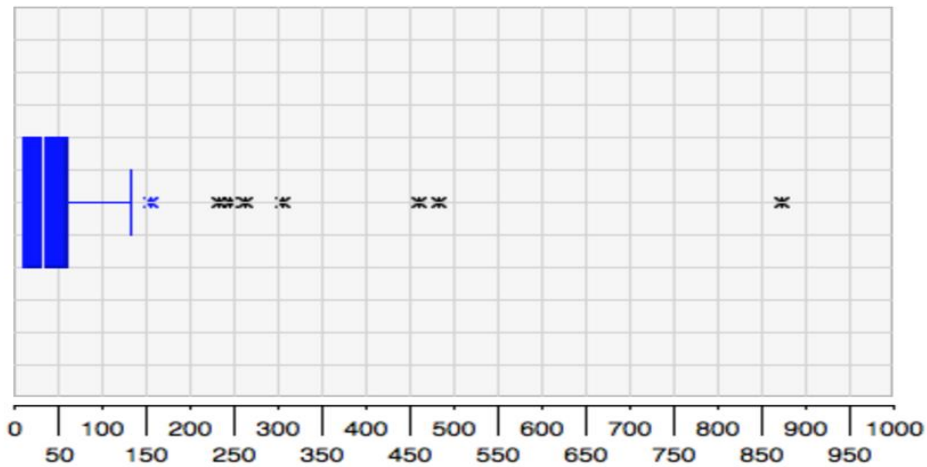


Figura 24. Valores de calprotectina en el grupo de niños con malabsorción de azúcares y/o grasas.

En el grupo de niños con infección bacteriana, la mediana fue de 123 $\mu\text{g/g}$ (Q1=89; mediana=123; Q3=265; mínimo=<10; máximo=369).

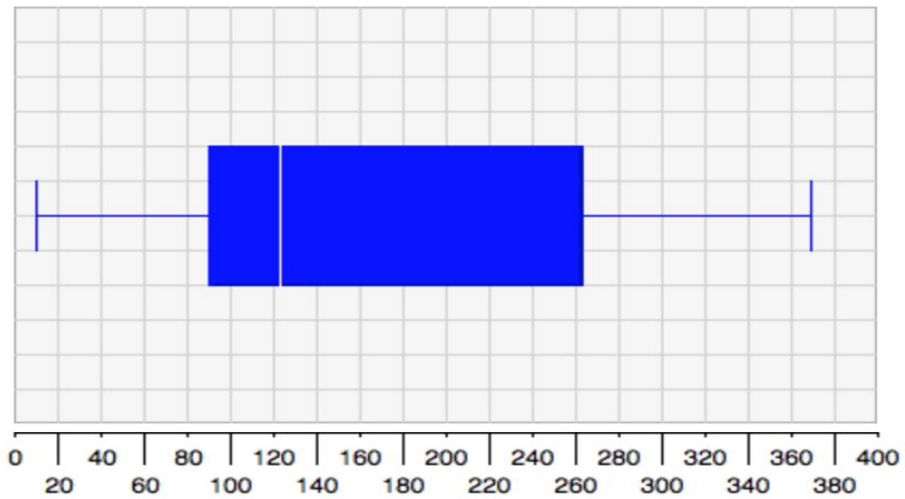


Figura 25. Valores de calprotectina en el grupo de niños con infección bacteriana.

En el grupo de niños con infección parasitaria en general, la mediana fue de <10 $\mu\text{g/g}$ (Q1=<10; mediana=<10; Q3=94; mínimo=<10; máximo=873).

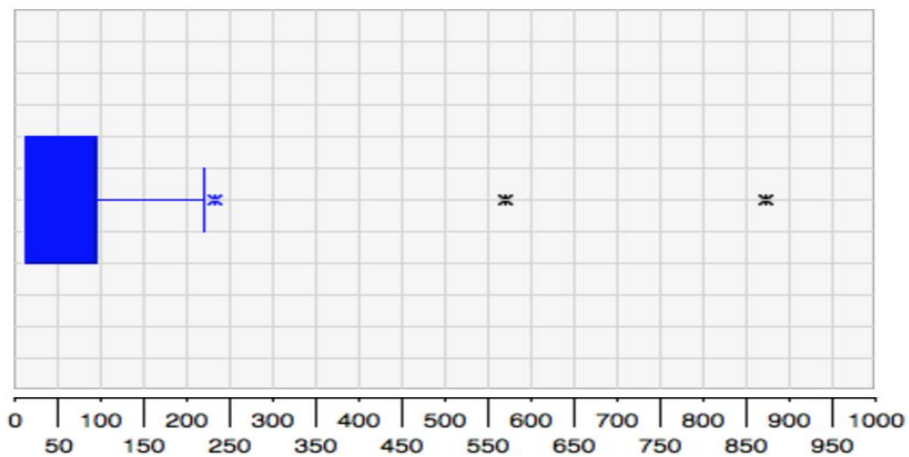


Figura 26. Valores de calprotectina en el grupo de niños con infección parasitaria.

En el grupo de niños con infección por parásitos patógenos (*Giardia sp* y *Cryptosporidium sp*), la mediana fue de <10 $\mu\text{g/g}$ (Q_1 =<10; mediana=<10; Q_3 =95; mínimo=<10; máximo=233).

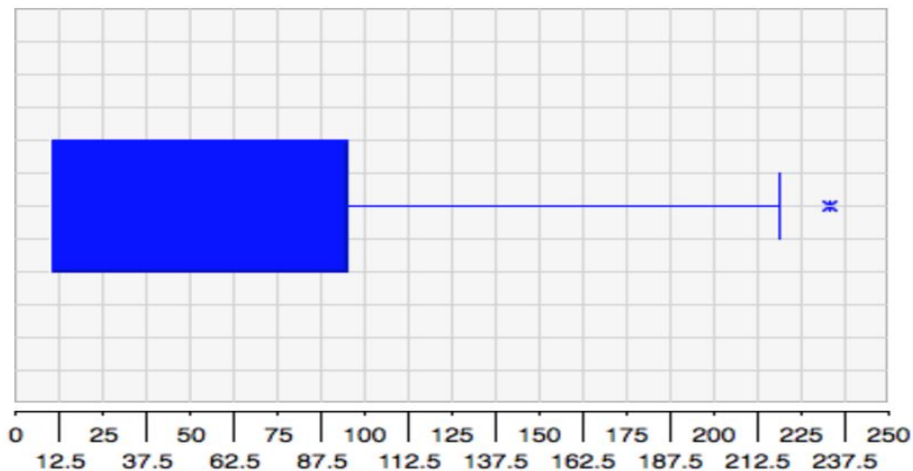


Figura 27. Valores de calprotectina en el grupo de niños con infección por parásitos patógenos.

En el grupo de niños con infección por parásitos no patógenos (*Blastocystis sp*), la mediana fue de 10 $\mu\text{g/g}$ (Q_1 =10; mediana=10; Q_3 =93; mínimo=10; máximo=873).

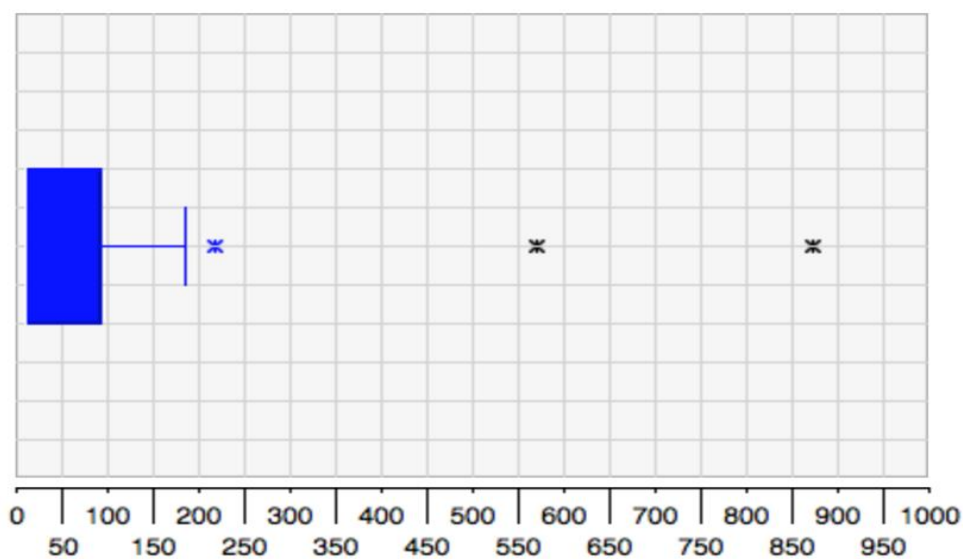


Figura 28. Valores de calprotectina en el grupo de niños con infección por parásitos no patógenos.

En el grupo de niños con infección parasitarias, valores por encima de 50 µg/g se constataron en:

Blastocystis sp: en dos pacientes con coinfección por *Salmonella* sp y *Campylobacter* sp, un paciente con enfermedad inflamatoria intestinal diagnosticada, dos pacientes con diarrea con sangre no filiada y un paciente con diarrea y dolor abdominal de 1 mes de evolución también sin filiar.

Cryptosporidium sp: dos pacientes con diarrea con sangre no filiada y un paciente con diarrea y dolor abdominal de 1 mes de evolución también sin filiar.

Giardia sp: en dos pacientes con coinfección por *Salmonella* sp, dos pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal diagnosticada y dos pacientes con diarrea y déficit de IgA.

2.8 Comparación de la capacidad de detectar diarrea inflamatoria de los leucocitos fecales y calprotectina

La cuantificación de la calprotectina proporcionó mejor rendimiento que la detección de leucocitos fecales en la detección de diarrea inflamatoria, 120 (>50 mcg/g) vs 62 casos.

La comparación de ambas técnicas, se realizó con el módulo de comparación de técnicas diagnósticas del programa Epidat 3.1, tomando como referencia la prueba de la calprotectina, demostró lo siguiente:

Nivel de confianza: 95,0%

Prueba diagnóstica	Prueba de referencia		Total
	Enfermos	Sanos	
Positivo	62	0	62
Negativo	58	657	715
Total	120	657	777

	Valor	IC (95%)	
Sensibilidad (%)	51,67	42,31	61,02
Especificidad (%)	100,00	99,92	100,00
Índice de validez (%)	92,54	90,62	94,45
Valor predictivo + (%)	100,00	99,19	100,00
Valor predictivo - (%)	91,89	89,82	93,96
Prevalencia (%)	15,44	12,84	18,05
Índice de Youden	0,52	0,43	0,61
Razón de verosimilitud +	-	-	-
Razón de verosimilitud -	0,48	0,40	0,58

Calprotectina

En general, en nuestro estudio se demuestra que los valores poblacionales de calprotectina en los niños con diarrea persistente o crónica son bajos (mediana 12 mcg/g) y que por tanto la mayoría de los niños estudiados no presentaban una diarrea crónica de origen inflamatorio. Estos resultados coinciden con otros estudios que constatan que la cuantificación de la calprotectina en heces es un método preciso para discriminar los pacientes con causa orgánica de diarrea crónica de aquellos con trastornos funcionales, sobre todo niños (Carroccio et al., 2003) y que es un método adecuado para identificar causas inflamatorias de diarrea crónica (Limburg et al., 2000; Von Arnim et al., 2016).

Sin embargo, se constata que en niños menores de 1 año estos valores son mucho más altos (mediana 227 mcg/g) que en la población general de niños estudiados donde la mediana se situaba en valores por debajo de 50 mcg/g (valores considerados normales). Este aspecto, se ha puesto en evidencia en otros estudios (Lehmann et al., 2015) donde se constata que en esta población no existen puntos de corte validados para discriminar la diarrea inflamatoria de la no inflamatoria. Aunque se han sugerido una amplia gama de puntos de corte (57-274 mcg /g), Diamanti et al. (2010) recomienda considerar valores de calprotectina de 160 mcg/g para discriminar diarrea inflamatoria en menores de un año.

Un análisis detallado entre el motivo clínico de petición y los valores de calprotectina encontrados muestran valores por debajo de 50 mcg/g en todos los motivos excepto en los casos de un diagnóstico clínico inicial de diarrea persistente y hematoquecia donde la mediana de calprotectina se situaba en 118,5 mcg/g. Este aspecto, se ha constatado recientemente en otros estudios que demuestran que la calprotectina representa aproximadamente el 30% del citosol de los neutrófilos y por lo tanto, la hematoquecia aumenta los niveles de calprotectina en la medida de la extensión del sangrado (Day et al., 2017).

De igual manera, en los niños con procesos de malabsorción de azúcares o grasas la mediana de calprotectina se situaba en valores normales (33 mcg/g). Estos

resultados coinciden con lo comunicado por Melchior et al que encuentran que los procesos de malabsorción o maladigestión per se, no incrementan los niveles de calprotectina (Melchior et al., 2017).

En los casos en que se constató un origen infeccioso de la diarrea, en niños diagnosticados de diarrea de origen bacteriano los valores de calprotectina se situaba a niveles patológicos (mediana 123 mcg/g); mientras que los casos asociados a diarrea de origen parasitario, los valores de calprotectina fueron muy bajos (mediana < 10 mcg/g), cuando este análisis se estratificó entre parásitos considerados patógenos y no patógenos los resultados fueron similares. Lo anterior, coincide con lo comunicado en otros estudios, que indican que la calprotectina fecal puede ser un marcador útil para el estudio de niños con diarrea infecciosa, ya que los valores de calprotectina aumentan en la infección bacteriana aguda y se relacionan con la severidad de la sintomatología (Shastri et al., 2008; Chen et al., 2012). En el caso de la diarrea crónica estos aspectos también se han puesto en evidencia, demostrándose además su utilidad en la evaluación y discriminación de la diarrea infecciosa de origen bacteriano en niños (Holtman et al., 2016).

En el caso particular de la diarrea parasitaria y aunque el intervalo intercuartílico solo incluía niños con valores normales de calprotectina, se constató que el rango alto del análisis incluía a niños con valores por encima de 50 mcg/g. En estos niños, la presencia de parásitos estaba asociada a diarrea bacteriana, enfermedad inflamatoria intestinal, hematoquecia o, procesos asociados a déficit de IgA o sin filiar, pero con sospecha de un origen autoinmune desde el punto de vista clínico. La utilidad de la calprotectina en el estudio de la diarrea parasitaria en niños está muy poco estudiada, pero los resultados del único estudio disponible coinciden con los hallazgos de nuestro estudio, de forma que ausencia de otras causas subyacentes asociadas a la presencia de parásitos en heces, los valores de calprotectina son muy bajos excepto en la infección por *Entamoeba histolytica* (Salman et al., 2017).

Con independencia de la forma de estratificar los valores de calprotectina en la población de niños con diarrea persistente o crónica, se demuestra que aunque los valores de la mediana se situaban en valores normales de calprotectina excepto en los casos de diarrea de origen bacteriano o de diarrea persistente con hematoquecia los intervalos intercuartílicos incluían valores patológicos de calprotectina que se asociaban a enfermedad inflamatoria intestinal, celiaquía o a la inclusión de niños menores de un año. Lo anterior puede afectar al valor discriminatorio de la calprotectina a la evaluar a niños que presentan diarrea persistente y sus valores deberían interpretarse junto a los síntomas clínicos y otras pruebas de laboratorio (Holtman et al., 2016).

Leucocitos

La sensibilidad de los leucocitos fecales (51,7%), fue muy inferior a la cuantificación de la calprotectina en la capacidad de detección de diarrea inflamatoria, este aspecto ha sido puesto en evidencia en otro trabajo (Granville et al., 2004). Aunque la detección de leucocitos fecales se usa a menudo para detectar diarrea inflamatoria, su utilidad es muy limitada como demuestra nuestro estudio. El mejor rendimiento de la calprotectina como marcador de inflamación detectado en nuestro estudio coincide con trabajos (Diamanti et al., 2010; Joishy et al., 2009) que ponen en evidencia la capacidad de la calprotectina para distinguir entre niños con diarrea persistente con y sin inflamación colorrectal.

3. Análisis en conjunto de los resultados de laboratorio

El estudio en conjunto de los resultados de las pruebas de laboratorio mostró que en el 11,3% de los casos en las heces se detectaba un microorganismo infeccioso, en

el 11,7% se demostraban procesos de malabsorción o maladigestión y en el 12,2% procesos inflamatorios (incluyendo solo a mayores de 1 año), aunque en muchas ocasiones, estos procesos no eran hallazgos aislados, sino que estaban interrelacionados.

En la tabla 25 se pueden observar con detalle estos resultados.

Diagnóstico de laboratorio	Número de pacientes	Porcentaje
Procesos de malabsorción	39	5%
Procesos de maladigestion	52	6,7%
Componente inflamatorio (>1 año)	79	12,2%
Etiología bacteriana	31	4%
Etiología parasitaria	55	7,1%
Etiología vírica	2	0,3%

Tabla 39. Análisis general de los resultados de laboratorio obtenidos.

**VI. PROPUESTA
DE
ALGORITMO
DIAGNÓSTICO**

VI. Propuesta de algoritmo diagnóstico para el estudio de parásitos en el síndrome de diarrea persistente pediátrico

El algoritmo propuesto en este estudio se ha diseñado para limitar los estudios parasitarios. El objetivo principal de dicho algoritmo sería reducir los costos hospitalarios generales e implementar un proceso de diagnóstico eficiente.

El concepto de restringir los estudios parasitarios en entornos de baja prevalencia no es nuevo, Morris et al. (1992) evaluó la práctica de restringir los estudios a una sola muestra en lugar de muestras múltiples llegaron a la conclusión de que esta práctica en un entorno de baja prevalencia era un medio eficaz para reducir los costos sin afectar negativamente la atención del paciente. Branda et al. (2006) llega a conclusiones similares con este enfoque y especula que la práctica de limitar el número de estudios es apropiada hasta una prevalencia del 20%.

En nuestro estudio, aunque la prevalencia general de parásitos fue del 7%, la prevalencia de parásitos con valor clínico contrastado fue del 2,7% e incluían exclusivamente *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum*. Diseñar un algoritmo diagnóstico que incluya solo *Giardia sp* o *Cryptosporidium parvum*, tampoco es nuevo y este enfoque ha sido propuesto en otros lugares de baja prevalencia (Beal et al., 2014; Mosli et al., 2012), que recomiendan plantear el estudio de parásitos en una segunda fase después de descartar otras condiciones clínicas más prevalentes en niños con diarrea crónica: mediante marcadores inflamatorios, nutricionales e inmunológicos, y posteriormente limitar el estudio de parásitos a la

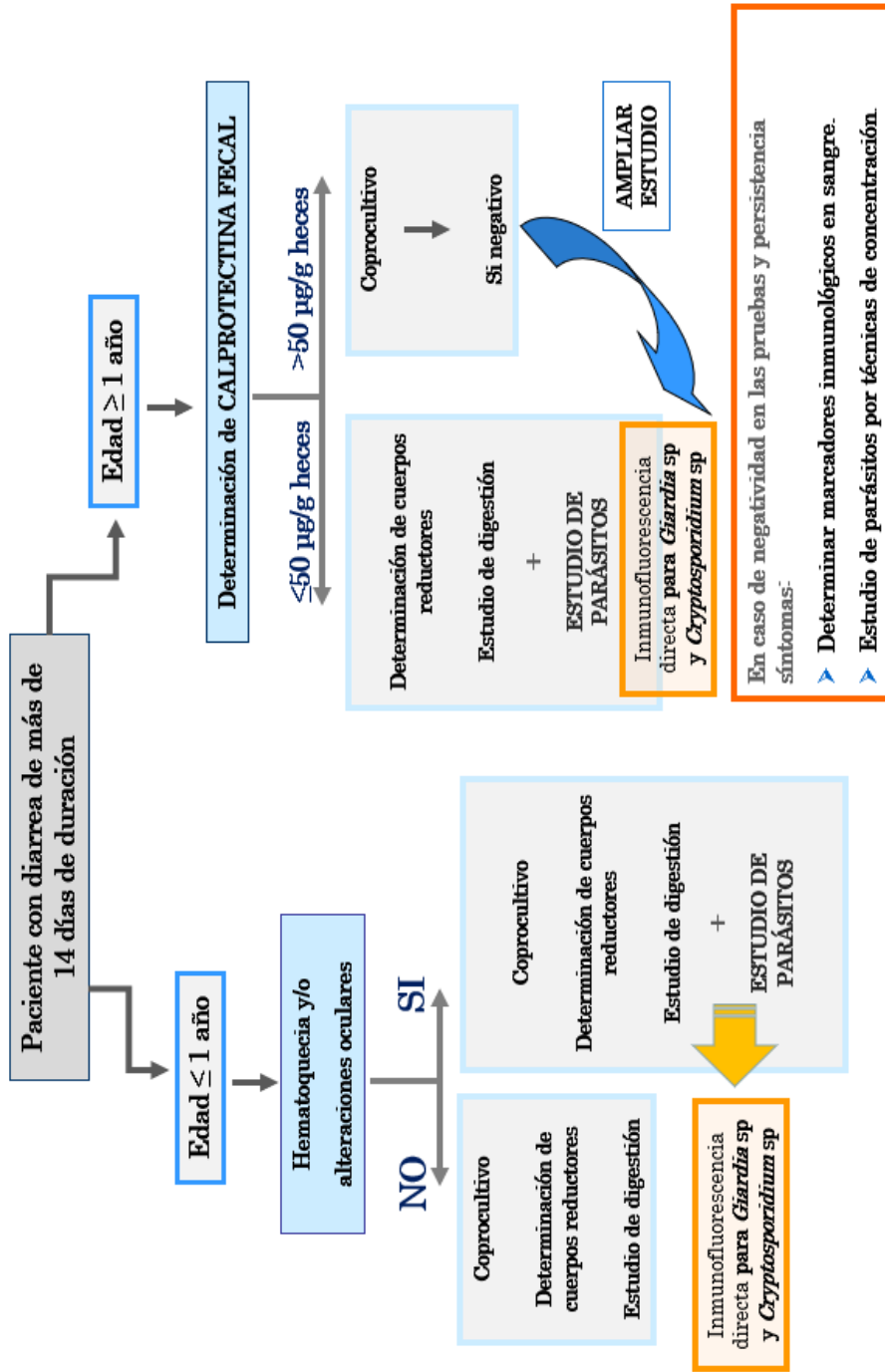
detección de *Giardia lamblia* *Cryptosporidium parvum* por técnicas no microscópicas.

Nuestro estudio, presenta aspectos no contemplados en estos trabajos reseñados, y es la carga parasitaria moderada o baja encontrada en niños con diarrea persistente y que debería ser tenido en cuenta en la evaluación de la diarrea.

En base a lo anterior, el algoritmo propuesto, se basaría en lo siguientes pasos.

1. Descartar otras condiciones clínicas mediante marcadores inflamatorios, nutricionales e inmunológicos.
2. Emplear una sola muestra de heces o un homogenizado de muestras de tres días consecutivos.
3. No emplear técnicas de concentración en un primer paso de la evaluación, sino técnicas de alta sensibilidad: microscopía de inmunofluorescencia para *Giardia lamblia* y microscopía fluorescente con tinción de auramina para *Cryptosporidium parvum*.
4. En casos especiales y tras revisión de la historia clínica, estudiar una nueva muestra mediante técnicas de concentración.

ALGORITMO DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME DE DIARREA CRÓNICA PEDIÁTRICO EN EL LABORATORIO CLÍNICO



VII. CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

1. En el 7,1% de las muestras de niños con clínica de diarrea persistente del Area Sanitaria adscrita la Hospital Universitario de Valme se detecta presencia de parásitos.

2. En función del tipo de parasito, se observó que el 2,6% correspondían a parasitos considerados clasicamente patógenos (*Giardia* sp y *Cryptosporidium* sp) y el 4,6% restante a parasitos considerados de dudoso valor patógeno (*Blastocystis* sp, *Dientamoeba* sp y *Endolimax* sp).

3. La clínica más prevalente asociada a los casos de parasitosis, fue el de diarrea persistente asociada a dolor abdominal, siendo común la presencia de manifestaciones clínicas extraintestinales.

4. La mediana de edad de los casos de parasitosis, era función del parásito asociado mostró que *Giardia* sp: presentaba un agrupamiento en torno a los 4 años, mientras que *Cryptosporidium* sp y *Blastocystis* sp: se presentaba un agrupamiento en torno a los 7 años.

5. La etiología bacteriana fue responsable del 3,9% de los casos, siendo *Campylobacter* sp era la etiología bacteriana más prevalente seguida de *Salmonella* sp y *Aeromonas* sp.

6. La presentación clínica de los casos de diarrea persistente bacteriana en niños fue similar a los casos de diarrea parasitaria, estando presente un síndrome de diarrea persistente asociada a dolor abdominal en más de la mitad de los casos.

7. En cuatro de los episodios de diarrea persistente la etiología parasitaria y bacteriana coexistieron.

8. El estudio en conjunto de las pruebas de laboratorio mostró que en el 11,3% de los casos se detectaba un microorganismo infeccioso, en el 11,7% se demostraban procesos de malabsorción o maladigestión y en el 12,2% procesos inflamatorios, aunque en muchas ocasiones, estos procesos no eran hallazgos aislados, sino que estaban interrelacionados.

9. En base a este estudio, en mas del 85% de los casos la diarrea se clasificó como funcional.

10. Los resultados de este trabajo demuestran que las técnicas moleculares son en general menos sensibles que la microscopía convencional para el diagnóstico de la infección parasitaria en niños con diarrea persistente debido a la baja carga parasitaria y a la presencia de inhibidores en las muestras.

11. El método de extracción de compuestos volátiles del espacio de cabeza estático empleado para el análisis de los compuestos volátiles mayoritarios en heces ha demostrado tener una sensibilidad suficiente y efectiva para discriminar entre muestras de heces de pacientes no infectados con el parásito de los que si lo estaban.

12. El perfil de compuestos volátiles de las heces de pacientes infectados con *Giardia* sp es diferente al de las heces de los pacientes con procesos diarreicos sin giardiasis.

13. El método de análisis cromatográfico empleado permite determinar compuestos volátiles como posibles biomarcadores de la presencia de *Giardia* en heces.

14. En base a los resultados, el estudio de parásitos en la diarrea persistente en niños, se debería plantear en base a algoritmos de decisión basados en técnicas de detección altamente sensibles.

VIII. REFERENCIAS

VIII. REFERENCIAS

Agger WA, McCormick JD, Furwith MJ. Clinical and microbiological features of *Aeromonas hydrophila*-associated diarrhea. *J Clin Microbiol* 1985;21:909-13.

Agnamey, P. Evaluation of four commercial rapid immunochromatographic assays for detection of *Cryptosporidium* antigens in stool samples: a blind multicenter trial. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49:1605–1607.

Ahmed F, Ansaruzzaman M, Haque E, et al. Epidemiology of post-shigellosis persistent diarrhea in young children. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20:525.

Al-Kateb H, Cunliffe N, deLacy Costello B, Probert C, Ratcliffe N. Pwe-169 analysis of faecal volatiles from young children infected with and without rotavirus. *Gut.* 2012; 61:364-365

Alles AJ, Waldron MA, Sierra LS, Mattia AR. Prospective comparison of direct immunofluorescence and conventional staining methods for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* sp. in human fecal specimens. *J Clin Microbiol* 1995;33:1632-4.

Altekruse, S. F., N. J. Stern, P. I. Fields, and D. L. Swerdlow. *Campylobacter jejuni*—an emerging foodborne pathogen. *Emerg. Infect. Dis.* 1999;5:28-35.

Álvarez Martínez M, Buesa Gómez J, Castillo García J, Vila Estape J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. 2008. 30. Vila Estape J (Coordinador). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017.

Aubry P. Malabsorption syndrome and intestinal parasitosis. *Med Trop (Mars).* 1983;43:317-24.

Azim T, Ahmad SM, Sefat-E-Khuda, Sarker MS, Unicomb LE, Hamadani JD, et al. Immune response of children who develop persistent diarrhea following rotavirus infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;6:6905.

Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005;307:1915–1920.

Baldassano RN, Liacouras CA. Chronic diarrhea. A practical approach for the pediatrician. *Pediatr Clin North Am*. 1991 Jun;38(3):667-86.

Bálint A, Dóczy I, Bereczki L, Gyulai R, Szúcs M, Farkas K, Urbán E, Nagy F, Szepes Z, Wittmann T, Molnár T. Do not forget the stool examination—cutaneous and gastrointestinal manifestations of *Blastocystis* sp. infection. *Parasitol Res*. 2014;113:1585-90.

Baqui AH, Sack RB, Black RE, et al. Enteropathogens associated with acute and persistent diarrhea in Bangladesh children less than 5 years of age. *J Infect Dis* 1992; 166:792.

Baran P. Diarrea crónica en el niño. *Evid Act Pract Ambul*. 2014;17:26-33.

Barbot L, Topouchian A, Capet C, Magne D, Huneau JF, Kapel N, Gobert JG. *Cryptosporidium* parvum: functional study of the intestinal malabsorption syndrome. *Ann Pharm Fr*. 2001; 59:305-11.

Barraquer I. Sur la coincidence de la lambliaze et de certains lesions du fond de l'oeil. *Bull Soc Pathol Exot*. 1938;31:55–8.

Bartelt LA, Sartor RB. Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. *F1000Prime Rep*. 2015;7:62.

Batty, C.A.; Cauchi, M.; Lourenco, C.; Hunter, J.O.; Turner, C. Use of the analysis of the volatile faecal metabolome in screening for colorectal cancer. *PLoS ONE* 2015, 10, e0130301

Beal SG, Couturier MR, Gander RM, Doern CD. Diagnostic Algorithm for the Diagnosis of Pediatric Parasitic Gastroenteritis. *J Clin Lab Anal.* 2014;30:155-60.

Behera B, Mirdha BR, Makharia GK, Bhatnagar S, Dattagupta S, Samantaray JC. Parasites in patients with malabsorption syndrome: a clinical study in children and adults. *Dig Dis Sci.* 2008;53:672-9.

Bhutta ZA, Nelson EA, Lee WS, Tarr PI, Zablach R, Phua KB, Lindley K, Bass D, Phillips A; Persistent Diarrhea Working Group. Recent advances and evidence gaps in persistent diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008;47:260-5.

Bilenko N, Levy A, Dagan R, Deckelbaum RJ, El-On Y, Fraser D. Does co-infection with *Giardia lamblia* modulate the clinical characteristics of enteric infections in young children? *Eur J Epidemiol.* 2004; 19:877-83.

Birkett A., Muir J., Phillips J., Jones G., O'Dea K. Resistant starch lowers fecal concentrations of ammonia and phenols in humans, *Am. J. Clin. Nutr.* 1996; 63:766–772.

Bond A, Vernon A, Reade S, Mayor A, Minetti C, Wastling J, Lamden K, Probert C. Investigation of volatile organic compounds emitted from faeces for the diagnosis of giardiasis. *J Gastrointest Liver Dis.* 2015; 24:281-286

de Boer, R. F., Ott, A., Kesztyus, B. and Kooistra-Smid, A. M. Improved detection of five major gastrointestinal pathogens by use of a molecular screening approach. *Journal of Clinical Microbiology.* 2010;48:4140–4146.

Boorom KF, Smith H, Nimri L, Viscogliosi E, Spanakos G, Parkar U, Li LH, Zhou XN, Ok UZ, Leelayoova S, Jones MS. Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. *Parasit Vectors.* 2008;1:40.

Branda JA, Lin TY, Rosenberg ES, Halpern EF, Ferraro MJ. A rational approach to the stool ova and parasite examination. *Clin Infect Dis* 2006;42:972-8.

- Brasitus TA. Parasites and malabsorption. *Am J Med.* 1979;67:1058-65.
- Brasitus TA. Parasites and malabsorption. *Clin Gastroenterol.* 1983;12:495-510.
- Bruijnesteijn van Coppenraet LE, Wallinga JA, Ruijs GJ, Bruins MJ, Verweij JJ. Parasitological diagnosis combining an internally controlled real-time PCR assay for the detection of four protozoa in stool samples with a testing algorithm for microscopy. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15:869-74.
- Buchwald DS , Blaser MJ. A review of human salmonellosis: II. Duration of excretion following infection with nontyphi *Salmonella*. *Rev Infect Dis* 1984; 6:345–56.
- Buijck M, Berkhout DJ, De Groot EF, Benninga MA, Van del Schee MP, Kneepkens CM, De Boer NK, De Meij TG. Sniffing out paediatric gastrointestinal diseases: The potential of volatile organic compounds as biomarkers for disease. *J Peediatr Gastroenterol Nutri.* 2016; 63:585-591
- Byrne S, Robson JMB. Advances in molecular diagnosis of parasitic enteropathogens. *Pathology.* 2015; 47:234-242.
- Cacciò SM, Chalmers RM. Human cryptosporidiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22:471-80.
- Carmena D, Cardona GA, Sánchez-Serrano LP. Current situation of *Giardia* infection in Spain: Implications for public health. *World J Clin Infect Dis.* 2012;2:1-12.
- Carroccio A, Iacono G, Cottone M, Di Prima L, Cartabellotta F, Cavataio F, Scalici C, Montalto G, Di Fede G, Rini G, Notarbartolo A, Aversa MR. Diagnostic accuracy of fecal calprotectin assay in distinguishing organic causes of chronic diarrhea from irritable bowel syndrome: a prospective study in adults and children. *Clin Chem.* 2003;49:861-7.

Carrol ME, Anast BP, Birch CL. *Giardiasis* and uveitis. Arch Ophthalmol 1961;65:775–8.

Cekin AH, Cekin Y, Adakan Y, Tasdemir E, Koclar FG, Yolcular BO. Blastocystosis in patients with gastrointestinal symptoms: a case-control study. BMC Gastroenterol. 2012;10:122.

Chan DK, Cadman L, Wang K. Diagnosing gastrointestinal illnesses using fecal headspace volatile organic compounds. 2016;22:1639-1649

Changsong W, Bo S, Lei G, Xiaoyang W, Chaofu K, Shanshan L, et al. Volatile organic metabolites identify patients with breast cancer, cyclomastopathy and mammary gland fibroma. 2014; 4: 1-6

Chen CC, Huang JL, Chang CJ, Kong MS. Fecal calprotectin as a correlative marker in clinical severity of infectious diarrhea and usefulness in evaluating bacterial or viral pathogens in children. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2012;55:541-7.

Chover Lara JL, Borrás Moliner MJ, Gozalbo M, Muñoz-Antoli C, Manrique I, Puchades Oliver C, Salazar Cifre A, Esteban Sanchis JG. Parasitosis intestinales en escolares de la ciudad de Valencia. Encuesta de prevalencia. Boletín Epidemiológico Semanal 2010;18:69-76.

Church C, Neill A, Schotthoefer AM. Intestinal infections in humans in the Rocky Mountain region, United States. J Parasitol. 2010;96: 194-6.

Clanton, C. J., Schmidt D. Sulfur compound in gases emitted from stored manure. Trans. ASAE. 2000; 43:1229– 1239

Clinical microbiology procedures handbook. Garcia, Lynne Shore; Isenberg, Henry D. 3rd ed. Washington, DC: ASM Press, c2010.

Cohen MB. Etiology and mechanisms of acute diarrhea in infants in the United States. *J Pediatr* 1991;118:34-9.

Coronel Rodríguez C, González Soria MD, Ruiz Pérez de Pipaón M, Bergara de la Fuente M, JAznar Martín J, Ramos Calero E, Guisado Rasco MC. Estudio epidemiológico de parásitos en niños en Sevilla. *Rev Esp Pediatr* 2017;73:225-232.

Corsi A, Nucci C, Knafelz D, Bulgarini D, Di Iorio L, Polito A, De Risi F, Ardeni F, Paone F M . Ocular changes associated with *Giardia lamblia* infection in children. *Br J Ophthalmol*. 1998;82:59–62.

Coutinho BP, Oriá RB, Vieira CM, Sevilleja JE, Warren CA, Maciel JG, Thompson MR, Pinkerton RC, Lima AA, Guerrant RL. *Cryptosporidium* infection causes undernutrition and, conversely, weanling undernutrition intensifies infection. *J Parasitol*. 2008;94:1225-32.

Crum-Cianflone NF. Salmonellosis and the gastrointestinal tract: more than just peanut butter. *Curr Gastroenterol Rep*. 2008;10:424-31.

Cunningham S, Sloan LM, Nyre LM, et al. Three-hour molecular detection of *Campylobacter*, *Salmonella*, *Yersinia*, and *Shigella* species in feces with accuracy as high as that of culture. *J Clin Microbiol* 2010;48:2929e2933.

Dagash M, Hayek T, Gallimidi Z, Yassin K, Brook JG. Transient radiological and colonoscopic features of inflammatory bowel disease in a patient with severe *Salmonella* gastroenteritis. *Am J Gastroenterol*. 1997; 92:349-51.

Day AS, Adamji M. Commentary: Impact of Fecal Calprotectin Measurement on Decision-Making in Children with Inflammatory Bowel Disease. *Front Pediatr*. 2017;5:133.

Del Chierico F., Nobili V., Vernocchi P., Russo A., Stefanis C.D., Gnani D., et al. Gut microbiota profiling of pediatric nonalcoholic fatty liver disease and obese

patients unveiled by an integrated meta-omics-based approach. *Hepatology* 2017; 65:451–464.

De Preter V., Coopmans T., Rutgeerts P., Verbeke K. Influence of long-term administration of lactulose and *Saccharomyces boulardii* on the colonic generation of phenolic compounds in healthy human subjects, *J. Am. Coll. Nutr.* 2006;25:541–549.

Diamanti A, Panetta F, Basso MS, Forgiione A, Colistro F, Bracci F, Papadatou B, Francalanci P, Torroni F, Knafelz D, Fina F, Castro M. Diagnostic work-up of inflammatory bowel disease in children: the role of calprotectin assay. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16:1926-30.

Di Cagno R., Rizzello C.G., Gagliardi F., Ricciuti P., Ndagijimana M., Francavilla R., et al. Different fecal microbiotas and volatile organic compounds in treated and untreated children with celiac disease. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75:3963–3971.

Dogruman-Al F, Simsek Z, Boorum K, Ekici E, Sahin M et al. Comparison of Methods for Detection of *Blastocystis* Infection in Routinely Submitted Stool Samples, and also in IBS/IBD Patients in Ankara, Turkey. *PLOS One* 2010;5:e15484.

DuPont HL. Persistent Diarrhea. A Clinical Review *JAMA.* 2016;315(24):2712-2723.

Elfving K, Andersson M, Msellem MI et al. Real-time PCR threshold cycle cutoffs help to identify agents causing acute childhood diarrhea in Zanzibar. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52: 916–23.

Elgaali H., Hamilton-Kemp T. R., Newman M. C., Collins R. W., Yu K. Comparison of long chain alcohols and other volatile compounds emitted from food-borne and

related gram positive and gram-negative bacteria. J. Basic Microbiol. 2002; 42: 373–380

EL-Marhoumy SM, EL-Nouby KA, Shoheib ZS, Salama AM. Prevalence and diagnostic approach for a neglected protozoon *Blastocystis* hominis. Asian Pac J Trop Dis 2015; 5: 51-59.

Erlandsen and E. A. Meyer, *Giardia* and *Giardiasis*: biology, pathogenesis, and epidemiology. Plenum Publishing Co., New York. 1984; 1:147-161.

Eroglu F, Genc A, Elgun G, & Koltas IS. Identification of *Blastocystis* hominis isolates from asymptomatic and symptomatic patients by PCR. Parasitology research. 2009;105:1589-92.

Escobedo AA, Hanevik K, Almirall P, Cimerman S, Alfonso M. Management of chronic *Giardia* infection. Expert Rev Anti Infect Ther. 2014;12:1143-57.

Fagundes-Neto U, Scaletsky IC. The gut at war: the consequences of enteropathogenic *Escherichia coli* infection as a factor of diarrhea and malnutrition. Sao Paulo Med J 2000; 118:21. 39.

Feldman: Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease, 9th ed, 2010, chapter 101.

Fleisher GR. Approach to diarrhea in children in resource-rich countries. Post TW, ed. UpToDate. Waltham, MA: UpToDate Inc. <http://www.uptodate.com> (Accessed on November 02, 2017).

Garcia LS, Shum AC, Bruckner DA. Evaluation of a new monoclonal antibody combination reagent for direct fluorescence detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens. J Clin Microbiol 1992;30:3255-7.

Garcia LS, Shimizu RY. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. J Clin Microbiol 1997;35:1526–1529.

Garcia, L.S., Practical Guide to Diagnostic Parasitology, 2nd edition. Washington: ASM Press, 2009.

García Martos P, Moreno B, Romero P, Pimentel R, Muñoz C, Fernández MT, De la O García de Lomas M. Parasitación intestinal por protozoos en niños de la Bahía de Cádiz. Rev San Hig Pública, 1989; 63: 79-84.

Garner CE, Ewer AK, Elasouad K, Power F, Greenwood R, Ratcliffe NM, Costello Bde L, Probert CS. Analysis of faecal volatile organic compounds in preterm infants who develop necrotizing enterocolitis: a pilot study. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2009; 49:559-565

Garner C.E., Smith S., Bardhan P.K., Ratcliffe N.M., Probert C.S. A pilot study of faecal volatile organic compounds in faeces from cholera patients in bangladesh to determine their utility in disease diagnosis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2009; 103:1171–1173

Garner C.E., Smith S., Costello B.L, White P., Spencer R., Probert C., et al. Volatile organic compounds from feces and their potential for diagnosis of gastrointestinal disease. FASEB Journal. 2007; 21:1675-1688.

Garnier-Lengliné H, Cerf-Bensussan N, Ruemmele FM. Celiac disease in children. Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology. 2015;39:544-551.

Gillon J. Clinical studies in adults presenting with *Giardiasis* to a gastrointestinal unit. Scott Med. J. 1985;30:89-95.

Gomila B, Anselem L, Esteban JG. Dientamoebosis: ¿una protozoosis intestinal olvidada?. SEIMC.2003;

<https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/.../Dientamoeba.pdf>

González-Moreno O, Domingo L, Teixidor J, Gracenea M. Prevalence and associated factors of intestinal parasitisation: a cross-sectional study among outpatients with gastrointestinal symptoms in Catalonia, Spain. *Parasitol Res.* 2011;108:87-93.

Gookin JL, Nordone SK, Argenzio RA. Host responses to *Cryptosporidium* infection. *J Vet Intern Med.* 2002;16:12-21.

Granville LA, Cernoch P, Land GA, Davis JR. Performance assessment of the fecal leukocyte test for inpatients. *J Clin Microbiol.* 2004;42:1254-6.

Gray J, Coupland LJ. The increasing application of multiplex nucleic acid detection tests to the diagnosis of syndromic infections. *Epidemiol Infect.* 2014;142:1-11.

Guarino A, Spagnuolo MI, Russo S, et al. Etiology and risk factors of severe and protracted diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995; 20:173.

Hammer HF, Hammer J. Diarrhea caused by carbohydrate malabsorption. *Gastroenterol Clin N Am.* 2012;41:611-27).

Handousa AE, el-Shazly AM, el-Nashaar NM, Hamouda MM. Malabsorption syndrome in patients with cryptosporidiosis. *J Egypt Soc Parasitol.* 1991;21:791-6.

Harris JC, Dupont HL, Hornick RB. Fecal Leukocytes in Diarrheal Illness. *Ann Intern Med.* 1972;76:697–703.

Hartmeyer GN, Hoegh SV, Skov MN, Dessau RB, Kemp M. Selecting PCR for the Diagnosis of Intestinal Parasitosis: Choice of Targets, Evaluation of In-House Assays, and Comparison with Commercial Kits. *Journal of parasitology research.* vol. 2017, Article ID 6205257.

Hailu T, Abera B. Performance evaluation of direct saline stool microscopy, Formol ether concentration and Kato Katz diagnostic methods for intestinal parasitosis in the absence of gold standard methods. *Trop Doct.* 2015;45:178-82.

Hawash Y. DNA extraction from protozoan oocysts/cysts in feces for diagnostic PCR. *Korean J. Parasitol.* 2014; 52: 263-71.

Heyman MB, Paterno VI, Ament ME: *Campylobacter* colitis: A cause of chronic diarrhea in children. *West J Med* 1982 Sep; 137:243-245.

Hill DR. *Giardia lamblia*. In: Gillespie SH, Pearson RD, eds. Principles and practice of clinical parasitology. Chisester, England: Joan Wiley & Sons; 2001.

Holmber SD, Farmer JJ. *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides* as causes of intestinal infections. *Rev Infect Dis* 1984;6:633-9.

Holtman GA, Lisman-van Leeuwen Y, Kollen BJ, Norbruis OF, Escher JC, Kindermann A, de Rijke YB, van Rheenen PF, Berger MY. Diagnostic Accuracy of Fecal Calprotectin for Pediatric Inflammatory Bowel Disease in Primary Care: A Prospective Cohort Study. *Ann Fam Med.* 2016;14:437-45.

Huang, R.S. Johnson CL, Pritchard L., Hepler R, Ton TT, Dunn JJ. Performance of the Verigene1 enteric pathogens test, Biofire FilmArray™ gastrointestinal panel and Luminex xTAG1 gastrointestinal pathogen panel for detection of common enteric pathogens. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2016;86:336–339.

Huicho L., Campos M., Rivera J., Guerrant R. L. Fecal screening tests in the approach to acute infectious diarrhea: a scientific overview. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1996; 15:486–494.

Huicho L., Garaycochea V., Uchima N., Zerpa R., Guerrant R. L. Fecal lactoferrin, fecal leukocytes and occult blood in the diagnostic approach to childhood invasive diarrhea. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1997; 16:644–647.

Hunter PR, Hughes S, Woodhouse S, Raj N, Syed Q, Chalmers RM, Verlander NQ, Goodacre J. Health sequelae of human cryptosporidiosis in immunocompetent patients. *Clin Infect Dis.* 2004;39:504-10.

Janssen R, Krogfelt KA, Cawthraw SA, van Pelt W, Wagenaar JA, Owen RJ. Host-pathogen interactions in *Campylobacter* infections: the host perspective. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:505-18.

JKellermayer R, Robert J Shulman RJ. Overview of the causes of chronic diarrhea in children in resource-rich countries. Post TW, ed. UpToDate. Waltham, MA: UpToDate Inc. <http://www.uptodate.com> (Accessed on November 02, 2017).

Johnson EH; Windsor JJ; Clark CG. Emerging from obscurity: biological, clinical, and diagnostic aspects of *Dientamoeba fragilis*. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17:553-70.

Joishy M, Davies I, Ahmed M, et al. Fecal calprotectin and lactoferrin as noninvasive markers of pediatric inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;48:48-54.

Jones, J. E., A. Balows, W. J. Hausler, M. Ohashi, and A. Turano, Laboratory diagnosis of infectious diseases Springer-Verlag, New York. 1988; 1:872-882.

Juranek, D. D. 1995. Cryptosporidiosis: sources of infection and guidelines for prevention. *Clin. Infect. Dis.* 1995; 21:57-61.

Kadota H., and Ishida Y. Production of volatile sulfur compounds by microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 1972; 26:127-138

Kassem HH, Zaed HA, Sadaga GA. Intestinal parasitic infection among children and neonatus admitted to Ibn-Sina Hospital, Sirt, Libya. *J Egypt Soc Parasitol.* 2007;37:371-80.

Keating JP. Chronic Diarrhea Pediatrics in Review. 2005; 26:5-14.

Kellermayer R, Robert J Shulman RJ. Overview of the causes of chronic diarrhea in children in resource-rich countries. Post TW, ed. UpToDate. Waltham, MA: UpToDate Inc. <http://www.uptodate.com> (Accessed on November 02, 2017).

Khare R, Espy MJ, Cebelinski E, Boxrud D, Sloan LM, Cunningham SA, et al. Comparative evaluation of two commercial multiplex panels for detection of gastrointestinal pathogens by use of clinical stool specimens. *J Clin Microbiol* 2014;52:3667-73.

Khoury MR, Huang G, Shiao YF. Sudan stain of fecal fat: new insight into an old test. *Gastroenterology*. 1989;96:421-7.

Knight, J. A. Free radicals: their history, and current status in aging and disease. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1998; 28:331–346.

Knox DL, King J. Retinal arteritis, iridocyclitis and *Giardiasis*. *Ophthalmology* 1982;89 :1303–8.

Kotloff KL, Losonsky GA, Morris JG Jr, Wasserman SS, Singh-Naz N, Levine MM. Enteric adenovirus infection and childhood diarrhea: an epidemiologic study in three clinical settings. *Pediatrics*. 1989 Aug;84(2):219-25.

Lanata CF, Black RE, Maúrtua D, et al. Etiologic agents in acute vs persistent diarrhea in children under three years of age in peri-urban Lima, Perú. *Acta Paediatr Suppl* 1992; 381:32.

Laude A, Valot S, Desoubieux G, Argy N, Nourrisson C, Pomares C, et al. Is real-time PCR-based diagnosis similar in performance to routine parasitological examination for the identification of *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum*/*Cryptosporidium hominis* and *Entamoeba histolytica* from stool samples? Evaluation of a new commercial multiplex PCR assay and literature review. *Clin Microbiol Infect.* 2016; 2:190.

Lecuit, M. and Eloit, M. The diagnosis of infectious diseases by whole genome next generation sequencing: a new era is opening. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2014; 4:25.

Leder K, Hellard ME, Sinclair MI, Fairley CK, Wolfe R. No correlation between clinical symptoms and *Blastocystis hominis* in immunocompetent individuals. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005;20:1390-4.

Lee KS, Kang DS, Yu J, Chang YP, Park WS. How to do in persistent diarrhea of children?: concepts and treatments of chronic diarrhea. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.* 2012;15:229-36.

Lee PC. Transient Carbohydrate Malabsorption and Intolerance in Diarrheal Diseases of Infancy. In *Chronic Diarrhea in Children*, edited by Emanuel Lebenthal. Nestle, Vevey/Raven Press, New York 1984.

Lehmann FS, Burri E, Beglinger C. The role and utility of faecal markers in inflammatory bowel disease. *Therap Adv Gastroenterol.* 2015;8:23-36.

Limburg PJ, Ahlquist DA, Sandborn WJ, Mahoney DW, Devens ME, Harrington JJ, Zinsmeister AR. Fecal calprotectin levels predict colorectal inflammation among patients with chronic diarrhea referred for colonoscopy. *Am J Gastroenterol.* 2000; 95:2831-7.

Lujan H and Nash T. The Uptake and Metabolism of Cysteine by *Giardia lamblia* Trophozoites. *Euk. Microbiol.* 1994; 41:169-175

Maas L, Dorigo-Zetsma JW, de Groot CJ, Bouter S, Plötz FB, van Ewijk BE. Detection of intestinal protozoa in paediatric patients with gastrointestinal symptoms by multiplex real-time PCR. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:545-50.

Madison-Antenucci, S. Multicenter evaluation of BD Max Enteric Parasite Real-Time PCR Assay for detection of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium hominis*,

Cryptosporidium parvum, and *Entamoeba histolytica*. J. Clin. Microbiol. 2016; 54:2681– 2688.

Manser M, Granlund M, Edwards H, Saez A, Petersen E, Evengard B, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Study Group on Clinical Parasitology.. Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in clinical laboratories in Europe – a comparative study. Clin. Microbiol. Infect. 2014; 20: 65– 71.

Manser MM, Saez AC, Chiodini PL. Faecal Parasitology: Concentration Methodology Needs to be Better Standardised. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10:e0004579.

Marawan A, Boughattas S, Behnke JM, Sharma A, Ismail A. Coproscopy and molecular screening for detection of intestinal protozoa. Parasites & Vectors. 2017;10:414-24.

Martín-Sánchez AM, Canut-Blasco A, Rodríguez-Hernández J, Montes-Martínez I, García-Rodríguez JA. Epidemiology and clinical significance of *Blastocystis hominis* in different population groups in Salamanca (Spain). Eur J Epidemiol.1992;8:553-9.

Marzel A, Desai PT, Goren A, Schorr YI, Nissan I, Porwollik S, Valinsky L, McClelland M, Rahav G, Gal-Mor O. Persistent Infections by Nontyphoidal *Salmonella* in Humans: Epidemiology and Genetics. Clin Infect Dis. 2016;62:879-886.

Mathai J, Raju B, Bavdekar A; Pediatric Gastroenterology Chapter, Indian Academy of Pediatrics. Chronic and persistent diarrhea in infants and young children: status statement. Indian Pediatr 2011;48:37-42.

McHardy IH, Wu M, Shimizu-Cohen R, Couturier MR, Humphries RM. Detection of intestinal protozoa in the clinical laboratory. J Clin Microbiol. 2014;52:712-20.

Melchior C, Aziz M, Aubry T, Gourcerol G, Quillard M, Zalar A, Coëffier M, Dechelotte P, Leroi AM, Ducrotté P. Does calprotectin level identify a subgroup among patients suffering from irritable bowel syndrome? Results of a prospective study. *United European Gastroenterol J.* 2017;5:261-269.

Mercado EH, Ochoa TJ, Ecker L, Cabello M, Durand D, Barletta F, Molina M, Gil AI, Huicho L, Lanata CF, Cleary TG. Fecal leukocytes in children infected with diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2011;49:1376-81.

Meyer EA, Radulescu S. *Giardia* and *Giardiasis*. *Adv. Parasitol.* 1979;17:1.

Moore SR. Persistent diarrhea in children in resource-limited countries. Post TW, ed. UpToDate. Waltham, MA: UpToDate Inc. <http://www.uptodate.com> (Accessed on November 02, 2017).

Mondal D, Minak J, Alam M, et al. Contribution of enteric infection, altered intestinal barrier function, and maternal malnutrition to infant malnutrition in Bangladesh. *Clin Infect Dis* 2012; 54:185.

Monteiro, L., D. Bonnemaïson, A. Vekris, K. G. Petry, J. Bonnet, R. Vidal, J. Cabrita, and F. Megraud. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35:995–998.

Moore JE, Crothers L, Millar BC, Crothers E, Rooney PJ, Xiao L, Dooley JS, Lowery CJ. Low incidence of concurrent enteric infection associated with sporadic and outbreak-related human cryptosporidiosis in Northern Ireland. *J Clin Microbiol.* 2002;40:3107-8.

Moore SR. Persistent diarrhea in children in resource-limited countries. Post TW, ed. UpToDate. Waltham, MA: UpToDate Inc. <http://www.uptodate.com> (Accessed on November 02, 2017.)

Moore, J. G., Jessop, L. D., and Osborne, D. N. Gaschromatographic and mass-spectrometric analysis of the odor of human feces. *Gastroenterology*. 1987; 93: 1321–1329

Morris AJ, Wilson ML, Reller LB. Application of rejection criteria for stool ovum and parasite examinations. *J Clin Microbiol* 1992;30:3213-6.

Mosli M, Gregor J, Chande N, Lannigan R. Nonutility of routine testing of stool for ova and parasites in a tertiary care Canadian centre. *Can J Microbiol*. 2012;58:653-9.

Muir JG., Yeow E.G., Keogh J., Pizzey C., Bird A.R., Sharpe K, et al. Combining wheat bran with resistant starch has more beneficial effects on fecal indexes than does wheat bran alone, *Am. J. Clin. Nutr.* 2004; 79:1020–1028.

Mumcuoglu I, Coskun FA, Aksu N, Purnak T, Gungor C. Role of *Dientamoeba fragilis* and *Blastocystis* spp. in irritable bowel syndrome. *Turkiye Parazitol Derg.* 2013;37:73–7.

Ngan PK, Khanh NG, Tuong CV, et al. Persistent diarrhea in Vietnamese children: a preliminary report. *Acta Paediatr* 1992; 81 Suppl 381:124. 38.

Ochoa TJ, Salazar-Lindo E, Cleary TG. Management of children with infection-associated persistent diarrhea. *Semin Pediatr Infect Dis* 2004; 15:229.

Ochoa TJ, Salazar-Lindo E, Cleary TG. Management of children with infection-associated persistent diarrhea. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2004;15:229-36.

Pankhurst L, Macfarlane-Smith L, Buchanan J, Anson L, Davies K, O'Connor L, et al. Can rapid integrated polymerase chain reaction-based diagnostics for gastrointestinal pathogens improve routine hospital infection control practice? A diagnostic study. *Health Technol Assess* 2014; 18:1-167.

Paulos, S. Evaluation of five commercial methods for the extraction and purification of DNA from human faecal samples for downstream molecular detection of the enteric protozoan parasites *Cryptosporidium* spp. *Giardia duodenalis*, and *Entamoeba* spp. J. Microbiol. Methods. 2016; 12:68–73.

Pawlowski SW, Warren CA, Guerrant R. Diagnosis and treatment of acute or persistent diarrhea. Gastroenterology. 2009;136:1874-86.

Pazzaglia G, Sack RB, Salazar E, Yi A, Chea E, Leon-Barua R, Guerrero CE, Palomino J. High frequency of coinfecting enteropathogens in *Aeromonas*-associated diarrhea of hospitalized Peruvian infants. J Clin Microbiol. 1991; 29:1151-6.

Pedraza Dueñas A, Ripoll Lozano MA, Sahagún Salcedo B. Infestación por *Giardia lamblia* en la población infantil de la Zona Básica de Salud de Avila rural este. Rev San Hig Pública 1994; 68: 399-404.

Perry, M. Evaluation of the Luminex xTAG Gastrointestinal Pathogen Panel and the Savyon Diagnostics Gastro- intestinal Infection Panel for the detection of enteric pathogens in clinical samples. J. Med. Microbiol. 2014; 63:1419–1426.

Pérez Armengol C, Ariza Astolfi C, Ubeda Ontiveros JM, Guevara Benítez DC, de Rojas Alvarez M, Lozano Serrano C. Epidemiología del parasitismo intestinal infantil en el valle del Guadalquivir. Rev Esp Salud Publica. 1997;71(6):547-52.

Pettoello M, Giardino I, Magli A, Di Martino L, Guandalini S. Intestinal *Giardiasis* associated with ophthalmologic changes. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1990; 11:196–200.

Phillips AD, Thomas AG, Walker-Smith JA. *Cryptosporidium*, chronic diarrhoea and the proximal small intestinal mucosa. Gut. 1992; 33:1057-61.

Pickering LK, DuPont HL, Olarte J, Conklin R, Ericsson C. Fecal leukocytes in enteric infections. *Am J Clin Pathol.* 1977; 68:562-5.

Platts-Mills JA, Babji S, Bodhidatta L, Gratz J, Haque R et al. Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). *Lancet Glob Health.* 2015;3:564-75.

Polage CR, Stoddard GJ, Rolfs RT, Petti CA. Physician use of parasite tests in the United States from 1997 to 2006 and in a Utah *Cryptosporidium* outbreak in 2007. *J Clin Microbiol.* 2011;49:591-6.

Polanco-Allué I, Ribes-Koninckx C. Enfermedad celíaca. *Protocolos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición.* Asociación Española de Pediatría 2010.

Poulsen CS, Stensvold CR. Systematic review on *Endolimax nana*: A less well studied intestinal ameba. *Trop Parasitol.* 2016;6:8-29.

Prieto Bozano G, Fernández Caamaño B. Malabsorción de hidratos de carbono *An Pediatr Contin.* 2014;12:111-8.

Probert CS, Jones PR, Ratcliffe NM. A novel method for rapidly diagnosing the causes of diarrhoea. *Gut.* 2004; 53:58-61

San Joaquin VH, Pickett DA. *Aeromonas*-associated gastroenteritis in children. *Pediatr Infect Dis J* 1988;7:53-7.

Sirinavin S, Garner P. Antibiotics for treating *Salmonella* gut infections. *Cochrane Database Syst Rev* 1999; <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001167>.

Sood M, Booth IW. Is prolonged rotavirus infection a common cause of protracted diarrhoea? *Arch Dis Child* 1999; 80:309.

Thomas PD, Forbes A, Green J, Howdle P, Long R, Playford R, Sheridan M, Stevens R, Valori R, Walters J, Addison GM, Hill P, Brydon G. Guidelines for the investigation of chronic diarrhoea, 2nd edition. *Gut*. 2003 Jul;52 Suppl 5:v1-15.

Ramakrishna BS, Venkataraman S, Mukhopadhyaya A. Tropical malabsorption. *Postgrad Med J*. 2006; 82:779.

Ramos Boluda E, Sarriá Osés J, Acuña Quirós MD, Álvarez Coca J. Diarrea crónica. 2010. *Protocolos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición*. Asociación Española de Pediatría, Sociedad Española de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica. 2010.

Rehn M, Wallensten A, Widerström M, Lilja M, Grunewald M, Stenmark S, Kark M, Lindh J. Post-infection symptoms following two large waterborne outbreaks of *Cryptosporidium hominis* in Northern Sweden, 2010-2011. *BMC Public Health*. 2015;15:529.

Restrepo Von Schiller, I. C., Mazo Berrío, L. P., Salazar Giraldo, M. L., Montoya Palacio, M. N., & Botero Garcés, J. H. Evaluation of three coproparasitoscopic techniques for the diagnosis of intestinal geohelminthiases. *Iatreia*. 2013;26:15-24.

Riddle MS, Gutierrez RL, Verdu EF, Porter CK. The chronic gastrointestinal consequences associated with *Campylobacter*. *Curr Gastroenterol Rep*. 2012;14:395-405.

Rijsman LH, Monkelbaan JF, Kusters JG. Clinical consequences of polymerase chain reaction-based diagnosis of intestinal parasitic infections. *J Gastroenterol Hepatol*. 2016;31:1808-15.

Robertson LJ, Hanevik K, Escobedo AA, Mørch K, Langeland N. *Giardiasis*--why do the symptoms sometimes never stop? *Trends Parasitol*. 2010;26:75-82.

Salman YJ, Mohammed SA, Razaq A. Fecal calprotectin among patients infected with some protozoan infections. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2017;6:3258-327.

Savola, K. L., E. J. Baron, L. S. Tompkins, and D. J. Passaro. Fecal leukocyte stain has diagnostic value for outpatients but not inpatients. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39:266–269.

Scanlan PD, Stensvold CR, Rajilić-Stojanović M, Heilig HG, De Vos WM, O'Toole PW, Cotter PD. The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS Microbiol Ecol.* 2014;90:326–30.

Schiller LR. Chronic diarrhea. *Gastroenterology.* 2004;127:287-93.

Schneeberger, P.H. Metagenomic diagnostics for the simultaneous detection of multiple pathogens in human stool specimens from Cote d'Ivoire: a proof-of-concept study. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 40:389–397.

Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L et al. PCR inhibitors— occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.* 2012; 113: 1014-26.

Schuurman T, Lankamp P, van Belkum A, Kooistra-Smid M, van Zwet A. Comparison of microscopy, real-time PCR and a rapid immunoassay for the detection of *Giardia lamblia* in human stool specimens. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13:1186-91.

Shastri YM, Bergis D, Povse N, Schäfer V, Shastri S, Weindel M, Ackermann H, Stein J. Prospective multicenter study evaluating fecal calprotectin in adult acute bacterial diarrhea. *Am J Med.* 2008;121:1099-106.

Shirasu M, Touhara K. The scent of disease: Volatile organic compounds of the human body related to disease and disorder. *J Biochem.* 2011; 150: 257-266

Sierra Pérez E, Álvarez-Coca González J. Diarrea crónica. Protocolos de gastroenterología. 2002. Disponible en: <http://www.aeped.es/protocolos/gastroenterologia/index.htm>

Smalley JR, Klish WJ, Brown MR, Campbell MA. Chronic diarrhea associated with *Campylobacter*. Clin Pediatr (Phila). 1982;21:220.

Spanel P, Smith D. Quantitative selected flow tube mass spectrometry: The influence of ionic diffusion and mass discrimination. J Am Soc Mass Spectrom. 2001; 12:863-872

Stark D, Roberts T, Ellis JT, Marriott D, Harkness J. Evaluation of the EasyScreen™ enteric parasite detection kit for the detection of *Blastocystis* spp., *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba* complex, and *Giardia intestinalis* from clinical stool samples. Diagn Microbiol Infect Dis 2014;78:149-52.

Stark D, Barratt J, Chan D, Ellis JT. *Dientamoeba fragilis*, the Neglected Trichomonad of the Human Bowel. Clin Microbiol Rev. 2016;29:553-80.

Stensvold CR. Thinking *Blastocystis* out of the box Trends Parasitol. 2012;28:305.

Stensvold CR, Clark CG. Current status of *Blastocystis*: A personal view. Parasitol Int. 2016;65:763-771.

Suarez, F. L., Springfield, J., and Levitt, M. D. Identification of gases responsible for the odour of human flatus and evaluation of a device purported to reduce this odour. Gut. 1998; 43:100–104

Tait E, Hill KA, Perry JD, Stanforth SP, Dean JR. Development of a novel method for detection of *clostridium difficile* using hs-spme-gc-ms. J Appl Microbiol. 2014; 116:1010-1019

Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. Clin Microbiol Rev 2008:639-65.

Tan KS, Mirza H, Teo JD, Wu B, Macary PA. Current views on the clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Curr Infect Dis Rep*. 2010;12:28-35.

Ten Hove R, Schuurman T, Kooistra M, Möller L, Van Lieshout L, Verweij JJ. Detection of diarrhoea-causing protozoa in general practice patients in The Netherlands by multiplex real-time PCR. *Clin Microbiol Infect* 2007;13:1001-7.

Tibble JA, Sigthorsson G, Foster R, Forgacs I, Bjarnason I. Use of surrogate markers of inflammation and Rome criteria to distinguish organic from nonorganic intestinal disease. *Gastroenterology*. 2002;123:450-60.

Turner JA. *Giardiasis* and infections with *Dientamoeba fragilis*. *Ped Clin North Am*. 1985;32:865-80.

Uchôa FFM, Sudré AP, Campos SDE, Almosny NRP. Assessment of the diagnostic performance of four methods for the detection of *Giardia duodenalis* in fecal samples from human, canine and feline carriers. *J Microbiol Methods*. 2018;145:73-8.

Vadlamudi N, Maclin J, Dimmitt RA, Thame KA. Cryptosporidial infection in children with inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*. 2013;7:e337-43.

Valle Navarro E, Navarro Piñeiro B. Incidencia de parasitosis intestinales en niños, hijos de aparceros del sur de la isla de Gran Canaria. *Rev San Hig Pùb* 1980; 54: 281- 287.

Vanathy K, Parija SC, Mandal J, Hamide A, Krishnamurthy S. Detection of *Cryptosporidium* in stool samples of immunocompromised patients. *Trop Parasitol*.2017;1:41-46.

Vaos G, Kostakis ID, Zavras N, Chatzemichael A. The role of calprotectin in pediatric disease. *Biomed Res Int*.2013;2013:542363.

Vassallo Matilla F, VosSaus R, Rivera Guerrero MA. Nuevas aportaciones al conocimiento de las enteroparasitosis humanas en el medio rural español. Rev San Hig Púb 1982; 56: 285-298).

Velasco-Benitez CA. El examen de heces en diarrea infantil. Revista Gastrohnp. 2004; 6: 1: 23-25.

Vernacchio L, Vezina RM, Mitchell AA, Lesko SM, Plaut AG, Acheson DW. Characteristics of persistent diarrhea in a community-based cohort of young US children. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2006;43:52-8.

Verweij, J. J., J. Schinkel, D. Laeijendecker, M. A. A. van Rooyen, L. Van Lieshout, and A. M. Polderman. 2003. Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. Mol. Cell. Probes 17:223–225.

Verweij JJ, van Lieshout L. Intestinal parasitic infections in an industrialized country; a new focus on children with better DNA-based diagnostics. Parasitology. 2011;138:1492-8.

Verweij, J.J. and Stensvold, C.R. Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. Clin. Microbiol. Rev. 2014;27:371–418.

Vila V, Colomer L, Pich M. Diarrea crónica. An Pediatr Contin. 2005;3(5):271-6.

Von Arnim U, Wex T, Ganzert C, Schulz C, Malfertheiner P. Fecal calprotectin: a marker for clinical differentiation of microscopic colitis and irritable bowel syndrome. Clin Exp Gastroenterol. 2016;9:97-103.

Weaver LT. Bowel habit from birth to old age. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1988;7:637-40.

Wojnowski W., Partyka A., Dymerski T., Gebicki J., Namiesnik J. Electronic noses in medical diagnostics. *Curr. Med. Chem.* 2018;25:1–9. doi: 10.2174/0929867324666171004164636.

Wolfe MS. *Giardiasis*. *Clin Microbiol Rev.* 1992;5:93-100.

Zahn, J. A., DiSpirito A. A., Do Y. S., Brooks B. E., Cooper E. E., Hatfield J. L. Correlation of human olfactory responses to airborne concentrations of malodorous. 2001; 30: 624-34.

Zella GC, Israel EJ. Chronic diarrhea in children. *Pediatr Rev* 2012;33:207-17.

Zinneman HH, Kaplan AP. The association of *Giardiasis* with reduced intestinal secretory immunoglobulin A. *Am J Dig Dis.* 1972;17:793-7.