

Procedimiento de Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica



69.

Diagnóstico de parasitosis importadas en España

Editores

Emilia Cercenado Mansilla
Rafael Cantón Moreno

Coordinador

Miriam J. Álvarez-Martínez

Autores

Miriam J. Álvarez-Martínez
Moncef Belhassen-García
María D. Flores-Chavez
Ana Pérez de Ayala Balzola
Elena Sulleiro Igual



ISBN: 978-84-09-24487-4

EDITORES:

Emilia Cercenado Mansilla. Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.
Rafael Cantón Moreno, Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Madrid.

SUGERENCIA DE CITACIÓN:

Álvarez-Martínez M J, Belhassen-García M, Flores-Chavez MD, Pérez de Ayala A, Sulleiro E. 2020. 69. Diagnóstico de parasitosis importadas en España. Álvarez-Martínez M J (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2020.

AVISO:

Reservados todos los derechos. Los documentos SEIMC o cualquiera de sus partes no podrán ser reproducidos, almacenados, transmitidos, distribuidos, comunicados públicamente o transformados mediante ningún medio o sistema sin la previa autorización de sus responsables, salvo excepción prevista por la ley. Cualquier publicación secundaria debe referenciarse incluyendo “Este documento ha sido elaborado por la SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) y su contenido puede encontrarse en la página web www.seimc.org”

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores:

Emilia Cercenado Mansilla

Rafael Cantón Moreno

69. Diagnóstico de parasitosis importadas en España. 2020

Coordinador:

Miriam J. Álvarez-Martínez¹

Autores:

Miriam J. Álvarez-Martínez¹

Moncef Belhassen-García²

Maria D. Flores-Chavez³

Ana Pérez de Ayala Balzola⁴

Elena Sulleiro Igual⁵



¹Servicio de Microbiología. Hospital Clínic. ISGLOBAL. Universidad de Barcelona (Barcelona), ² Servicio de Medicina Interna. Unidad de Enfermedades Infecciosas. Complejo Asistencial Universitario de Salamanca (CAUSA). Instituto de Investigaciones Biomedicas de Salamanca (IBSAL). Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS). Universidad de Salamanca, ³Fundación Mundo Sano España. Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III (Madrid), ⁴Servicio de Microbiología. Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid), ⁵Servei de Microbiologia. Hospital Vall d'Hebron. PROSICS Barcelona. Universitat Autònoma de Barcelona (Barcelona).

PARÁSITOS HEMÁTICOS Y TISULARES

1.	Introducción	8
2.	Principios generales del diagnóstico	8
	2.1. Recogida y transporte de muestras.....	8
	2.1.1 Otras muestras.....	9
3.	Principales protozoosis hemotisulares	9
	3.1. Leishmaniasis	9
	3.1.1 Características generales.....	9
	3.1.2 Cuadro clínico.....	9
	3.1.2.1 Leishmaniasis cutánea (LC).....	10
	3.1.2.2 Leishmaniasis mucocutánea (LMC).....	10
	3.1.2.3 Leishmaniasis visceral (LV).....	11
	3.1.2.4 Co-infección <i>Leishmania</i> /VIH.....	11
	3.1.2.5 Epidemiología.....	11
	3.1.3 Diagnóstico de laboratorio.....	12
	3.1.3.1 Examen microscópico y cultivo.....	12
	3.1.3.2 Pruebas de detección de antígeno.....	13
	3.1.3.3 Técnicas serológicas.....	14
	3.1.3.4 Detección de ácidos nucleicos.....	16
	3.2. Paludismo	20
	3.2.1 Características generales.....	20
	3.2.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos.....	21
	3.2.3 Diagnóstico de laboratorio.....	21
	3.2.3.1 Examen microscópico.....	21
	3.2.3.2 Pruebas de detección de antígeno.....	23
	3.2.3.3 Técnicas serológicas.....	25
	3.2.3.4 Detección de ácidos nucleicos.....	25
	3.3. Enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana	28
	3.3.1 Características generales.....	28
	3.3.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos.....	29
	3.3.2.1 Fase aguda.....	29
	3.3.2.2 Fase crónica.....	30
	3.3.2.3 Reactivación aguda.....	30
	3.3.2.4 Epidemiología.....	31
	3.3.3 Diagnóstico de laboratorio.....	31
	3.3.3.1 Examen microscópico.....	31
	3.3.3.2 Pruebas de detección de antígeno.....	34
	3.3.3.3 Técnicas serológicas.....	34
	3.3.3.3.1 Serodiscrepancias.....	36
	3.3.3.4 Detección de ácidos nucleicos.....	37
	3.4. Tripanosomiasis humana africana	41
	3.4.1 Características generales.....	41
	3.4.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos.....	42
	3.4.3 Diagnóstico de laboratorio.....	43
	3.4.3.1 Examen microscópico.....	43
	3.4.3.2 Técnicas de detección de antígeno.....	45
	3.4.3.3 Técnicas serológicas.....	45
	3.4.3.4 Detección de ácidos nucleicos.....	46

4.	Infecciones por nematodos tisulares	49
	4.1 Filariasis linfáticas	49
	4.1.1 Características generales.....	49
	4.1.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos.....	50
	4.1.3 Diagnóstico de laboratorio.....	50
	4.1.3.1 Examen microscópico.....	50
	4.1.3.2 Técnicas serológicas.....	50
	4.1.3.3 Técnicas de detección de antígeno.....	51
	4.1.3.4 Detección de ácidos nucleicos.....	51
	4.2 Oncocerciasis	51
	4.2.1 Características generales.....	51
	4.2.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos.....	52
	4.2.3 Diagnóstico de Laboratorio.....	53
	4.2.3.1 Examen microscópico.....	53
	4.2.3.2 Técnicas serológicas.....	53
	4.2.3.3 Detección de ácidos nucleicos.....	54
	4.2.3.4 Otras técnicas diagnósticas.....	54
	4.3 Loasis	54
	4.3.1 Características generales.....	54
	4.3.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos.....	55
	4.3.3 Diagnóstico de laboratorio.....	55
	4.3.3.1 Examen microscópico.....	56
	4.3.3.2 Técnicas serológicas.....	56
	4.3.3.3 Técnicas de detección de antígeno.....	56
	4.3.3.4 Detección de ácidos nucleicos.....	57
	4.4 Parasitación por <i>Mansonella</i> spp	57
	4.4.1 Características generales.....	57
	4.4.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos.....	57
	4.4.3 Diagnóstico de laboratorio.....	58
	4.4.3.1 Examen microscópico.....	58
	4.4.3.2 Detección de ácidos nucleicos.....	58
	4.5 Filariasis autóctonas de Europa (dirofilariasis)	58
	4.5.1 Características generales.....	58
	4.5.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos.....	58
	4.5.3 Diagnóstico de laboratorio.....	59
	4.5.3.1 Examen microscópico.....	59

PARÁSITOS INTESTINALES

5.	Introducción	60
6.	Principios generales de diagnóstico	60
	6.1 Recogida y transporte de muestras.....	60
	6.1.1 Muestras de heces.....	60
	6.1.2 Otras muestras.....	61
	6.1.2.1 Suero.....	61
	6.1.2.2 Orina.....	61
	6.1.2.3 Muestras menos frecuentes.....	61
	6.2 Observación microscópica.....	62
	6.3 Métodos de concentración de heces.....	62
	6.4 Otros métodos.....	62
	6.4.1 Estudios de larvas.....	62

6.4.2 Tinciones.....	63
6.4.3 Técnicas de detección de antígeno.....	63
6.4.4 Examen macroscópico.....	64
6.4.5 Técnicas moleculares.....	64
7. Protozoos.....	64
7.1 Amebiasis.....	64
7.1.1 Características generales.....	64
7.1.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos.....	64
7.1.3 Diagnóstico de Laboratorio.....	65
7.1.3.1 Examen microscópico.....	65
7.1.3.2 Pruebas de detección de antígeno.....	65
7.1.3.3 Técnicas serológicas.....	65
7.1.3.4 Detección de ácidos nucleicos.....	66
7.2 Giardiosis.....	66
7.2.1 Características generales.....	66
7.2.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos.....	66
7.2.3 Diagnóstico de Laboratorio.....	66
7.2.3.1 Examen microscópico.....	66
7.2.3.2 Pruebas rápidas de detección de antígeno.....	67
7.2.3.3 Detección de ácidos nucleicos.....	67
7.3 Infecciones por coccidios: criptosporidiosis, ciclosporidiosis, cystoisosporidiosis.....	67
7.3.1 Características generales.....	67
7.3.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos.....	67
7.3.3 Diagnóstico de laboratorio.....	67
7.3.3.1 Examen microscópico.....	67
7.3.3.2 Detección de antígeno.....	68
7.3.3.3 Detección de ácidos nucleicos.....	68
7.4 Otros Protozoos.....	68
7.4.1 Infección por <i>Dientamoeba fragilis</i>	68
7.4.2 Infección por <i>Blastocystis hominis</i>	68
8. Helmintos: nematodos.....	69
8.1 Estrongiloidiasis.....	69
8.1.1 Características generales.....	69
8.1.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos.....	69
8.1.3 Diagnóstico de Laboratorio.....	70
8.1.3.1 Examen microscópico y cultivo.....	70
8.1.3.2 Técnicas serológicas.....	70
8.1.3.3 Detección de ácidos nucleicos.....	70
8.2 Gnathostomiasis.....	71
8.2.1 Características generales.....	71
8.2.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos.....	71
8.2.3 Diagnóstico de Laboratorio.....	72
8.2.3.1 Técnicas serológicas.....	73
8.2.3.2 Detección de ácidos nucleicos.....	73
8.3 Otros Nematodos (<i>Trichuris trichuria</i>, <i>Ascaris lumbricoides</i>, uncinarias).....	73
8.3.1 Características generales.....	73
8.3.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos.....	74
8.4 Oxiuriasis.....	76
8.4.1 Características generales.....	76
8.4.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos.....	76

8.4.3 Características generales.....	76
8.4.3.1 Examen microscópico.....	77
8.4.3.2 Técnicas serológicas y detección de ácidos nucleicos.....	77
8.3.3 Diagnóstico de laboratorio.....	74
8.3.3.1 Examen macro y microscópico.....	75
8.3.3.2 Detección de ácidos nucleicos.....	75
9. Helmintos: trematodos.....	77
9.1 Esquistosomiasis.....	77
9.1.1 Características generales.....	77
9.1.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos.....	78
9.1.3 Diagnóstico de laboratorio.....	79
9.1.3.1 Examen microscópico.....	79
9.1.3.2 Técnicas serológicas.....	80
9.1.3.3 Detección de ácidos nucleicos.....	81
9.2 Fasciolosis.....	82
9.2.1 Características generales.....	82
9.2.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos.....	83
9.2.3 Diagnóstico de laboratorio.....	84
9.2.3.1 Examen microscópico.....	84
9.2.3.2 Técnicas serológicas.....	85
9.2.3.3 Detección de ácidos nucleicos.....	85
9.3 Teniasis.....	85
9.3.1 Características generales.....	85
9.3.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos.....	85
9.3.3 Diagnóstico de laboratorio.....	86
9.3.3.1 Examen microscópico.....	87
9.3.3.2 Técnicas serológicas.....	87
9.3.3.3 Detección de ácidos nucleicos.....	87
9.4 Hidatidosis.....	88
9.4.1 Características generales.....	88
9.4.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos.....	88
9.4.3 Diagnóstico de laboratorio.....	89
9.4.3.1 Examen microscópico.....	89
9.4.3.2 Técnicas serológicas.....	89
9.4.3.3 Detección de ácidos nucleicos.....	90
10. Bibliografía.....	91

DOCUMENTOS TÉCNICOS

- PNT-PI-01.** Examen microscópico de sangre para detección de malaria
- PNT-PI-02.** Detección de antígenos de *Plasmodium* spp.
- PNT-PI-03.** Detección de *Trypanosoma* spp. en sangre
- PNT-PI-04.** Detección de *Leishmania* spp. en muestras clínicas
- PNT-PI-05.** Examen de filarias en sangre
- PNT-PI-06.** Prueba de migración-cultivo de larvas de nematodos
- PNT-PI-07.** Procedimiento integral para el diagnóstico de malaria
- PNT-PI-08.** Detección de ADN de *Trypanosoma cruzi* mediante PCR

1. INTRODUCCIÓN

El incremento del número de personas afectadas por parásitos hemáticos y tisulares importados es una realidad. En la actualidad se han desdibujado las fronteras para muchos de estos parásitos y para una gran mayoría de patógenos. Los movimientos poblacionales, por turismo, cooperación, negocios o migración, son fenómenos muy dinámicos y siempre con tendencia al alza. Por ello, los laboratorios de Microbiología deben estar preparados para realizar la detección directa o la demostración indirecta de la infección por cualquier parásito importado. A continuación, se detalla la información necesaria para realizar el diagnóstico de las principales infecciones importadas causadas por parásitos hemáticos y tisulares. Este procedimiento complementa y actualiza algunos de los aspectos desarrollados en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 35, publicado en 2009.

2. PRINCIPIOS GENERALES DE DIAGNÓSTICO

2.1 RECOGIDA Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

Este apartado está ampliamente desarrollado en el procedimiento microbiológico: Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. (<https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1b.pdf>). Además, detalles particulares según el parásito, se describen en los respectivos apartados. A continuación se resaltan algunos conceptos generales.

No se debe olvidar que dependiendo del momento y, por lo tanto, la evolución de la infección, en el que el paciente entre en contacto con el sistema sanitario, algunas técnicas pueden presentar resultados negativos aun teniendo una alta sensibilidad. Un resultado negativo no descarta necesariamente la infección. Si la sospecha clínica es alta, en los procesos agudos es recomendable la recogida de muestras de forma seriada en diferentes momentos en un mismo día o en la misma semana, y en los procesos crónicos, transcurridos algunos meses (3 a 6).

Para el diagnóstico de una parasitosis hemática, la obtención de una muestra de sangre es el procedimiento menos invasivo, y aunque el tipo de anticoagulante no influirá en gran medida en la eficiencia de las técnicas de diagnóstico, es recomendable el uso de tubos con EDTA.

Para el correcto cribado de filarias hay que tener en cuenta su periodicidad y realizar la extracción de sangre en el momento adecuado.

Para la observación directa de parásitos es importante analizar la muestra lo antes posible, como muy tarde dentro de las 4 horas posteriores a su recogida. Las características morfológicas pueden verse afectadas por el retraso en la visualización. Durante este tiempo la muestra puede mantenerse a temperatura ambiente. Para su análisis mediante métodos moleculares o para un posterior envío al laboratorio, se puede conservar a 4°C.

La gran mayoría de técnicas serológicas se pueden realizar con suero o plasma sin inconvenientes, no obstante, es aconsejable seguir las instrucciones de los fabricantes de cada prueba. Para facilitar la separación del suero o el plasma del resto de componentes sanguíneos es recomendable recoger la sangre en tubos con gel separador. Tras la centrifugación y hasta su análisis la temperatura adecuada de conservación es 4°C. Si se congelan durante su conservación, es conveniente evitar ciclos de congelación/descongelación para impedir la pérdida de reactividad.

Si la sospecha clínica es leishmaniasis visceral y no se hubiera detectado la presencia de *Leishmania* spp. en sangre, será necesario recurrir a la obtención de médula ósea, en cuyo caso es conveniente recogerla en un tubo con anticoagulante (preferentemente EDTA).

En las infecciones cutáneas y mucocutáneas, por lo general, la sangre, el plasma o el suero no aportarán información. Para la detección del parásito será necesario realizar una biopsia, que se puede recoger en un tubo con solución salina estéril. Dependiendo de la situación de la lesión y el estado o edad del paciente, también se pueden analizar los aspirados de esas lesiones utilizando solución salina estéril.

La biopsia cutánea exangüe es la técnica de elección para el diagnóstico de las filarias cutáneas. Se recoge en un tubo con unas gotas de suero salino, o si es posible, se debe realizar en el mismo laboratorio.

Gracias a los medios de transporte de los que hoy disponemos, las muestras se pueden enviar a temperatura ambiente. Sólo si el envío implicase más de un día de tránsito será necesaria la refrigeración o la congelación.

2.1.1 Otras muestras

Por lo general, mediante las técnicas serológicas y/o moleculares, la muestra de sangre permitirá realizar el diagnóstico de la mayoría de las parasitosis hemáticas importadas, pero si se sospecha que el parásito ha traspasado la barrera hemato-encefálica, se debe obtener líquido cefalorraquídeo (LCR), no requiriendo anticoagulante ni pretratamiento. Para la observación directa mediante microscopía, cuanto antes se analice mejor. Para su estudio mediante métodos moleculares se puede conservar a 4°C.

Si la muestra es el propio nematodo, se puede utilizar como conservante solución salina o etanol al 70%. Es conveniente informar sobre el tipo de conservante que se use, para tenerlo en cuenta en el proceso de la extracción del ADN.

Mediante los métodos moleculares se puede analizar cualquier tipo de muestra, fresca o parafinada, conservada a temperatura ambiente, a 4°C o congelada. La eficiencia de estas técnicas dependerá de la carga parasitaria inicial en la muestra de partida, de las condiciones de su recogida y la cantidad obtenida. La probabilidad de detección del ácido nucleico del parásito será mayor, si se ha extraído el ADN a partir de la muestra más adecuada.

3. PRINCIPALES PROTOZOOSIS HEMOTISULARES

3.1 LEISHMANIASIS

3.1.1 Características generales

La leishmaniasis es una de las enfermedades tropicales desatendidas (NTDs, de sus siglas en inglés) reconocidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS). En los países en vías de desarrollo está estrechamente relacionada con la pobreza. Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades producidas por protozoos parásitos del género *Leishmania*, del que se conocen más de 20 especies diferentes. Estas infecciones son transmitidas por artrópodos del género *Phlebotomus* o *Lutzomyia*, de los que existen más de 90 especies transmisoras. El género *Leishmania* se divide en dos subgéneros, *Leishmania* y *Viannia*, a su vez, se subdividen en complejos y finalmente en especies.

Leishmania spp. es un protozoo dimórfico que adquiere a lo largo de su ciclo biológico dos formas bien diferenciadas, una móvil y flagelada en el hospedador invertebrado, denominada promastigote, y la otra inmóvil, intracelular y no flagelada, denominada amastigote que parasita las células del sistema fagocítico mononuclear del hospedador vertebrado. Los promastigotes son la forma extracelular que se desarrolla en el tubo digestivo del vector y en el medio de cultivo. Son fusiformes, de 7-15 µm de longitud y con un flagelo libre de unas 20 µm que emerge de la parte anterior del cuerpo. Los amastigotes son intracelulares obligados, con forma ovalada, con un diámetro de 2-4 µm. Tanto en los promastigotes como en los amastigotes puede observarse el kinetoplasto, estructura muy rica en ADN extracromosómico, que se corresponde con la única mitocondria que presentan estos protozoos.

Cuando una hembra de flebótomo infectada se alimenta de un hospedador, junto a su saliva le inocula los promastigotes metacíclicos presentes en su probóscide. Una vez que los parásitos se encuentran en los capilares

cutáneos del hospedador vertebrado, son fagocitados por los macrófagos y otros tipos de células fagocíticas mononucleares, son englobados en una vacuola parasitófora para tratar de eliminarlos mediante una cascada de metabolitos derivados del oxígeno (NO, H₂O₂, etc.) y la liberación de hidrolasas lisosomales. *Leishmania* spp. es capaz de evadir la respuesta inmune inespecífica del macrófago, diferenciarse a amastigote y multiplicarse en su interior. En este momento, la progresión de la infección depende de la eficacia en la respuesta inmune y la virulencia del parásito. Si los parásitos sobreviven, su multiplicación hace que los macrófagos se lisen liberando los amastigotes que son capaces de invadir nuevas células, aumentando así la carga parasitaria. Durante una nueva picadura del vector, los monocitos parasitados circulantes son ingurgitados por el flebótomo, en cuyo aparato digestivo se liberan los amastigotes que se transforman en promastigotes y, tras varios días, mediante un proceso denominado metacicloogénesis alcanzan la capacidad infectiva. Así los promastigotes metacíclicos quedan dispuestos en la proximidad de la probóscide para ser inoculados en un nuevo hospedador vertebrado (<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>).

Las leishmaniasis se consideran también enfermedades zoonóticas, a excepción de las leishmaniasis antroponóticas causadas por *L. donovani* y *L. tropica*. El perro es considerado el reservorio principal de las leishmaniasis causadas por *L. infantum*, sin embargo, en los últimos años, se ha demostrado la presencia del parásito en diferentes especies como el ratón, rata, tejón, mangosta, marta, gineta, lince ibérico, comadreja, lobo, zorro, conejo, liebre, gerbiles, damanes, zorro, oso hormiguero, titís, kinkajú, zarigüeyas, perezosos, etc.

La transmisión vectorial es el principal mecanismo de transmisión de *Leishmania* spp., pero existen otros mecanismos secundarios como son la transmisión vertical, la vía sexual, la transfusión sanguínea y los trasplantes de órganos. En la co-infección *Leishmania*/VIH se ha demostrado también la transmisión entre adictos a drogas por vía parenteral, al compartir jeringuillas.

3.1.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos

En la leishmaniasis las manifestaciones clínicas son muy diversas y dependen tanto de la especie causante de la infección como del estado inmunológico del individuo infectado. Las formas más leves cursan como lesiones cutáneas localizadas que en ocasiones curan espontáneamente, pero las más graves presentan afectación visceral y pueden resultar mortales sin un diagnóstico y tratamiento adecuado. Entre ambos polos, hay evoluciones crónicas que conducen a diversas formas clínicas, aunque se considera que las formas principales son la cutánea, la mucocutánea y la visceral.

3.1.2.1 Leishmaniasis cutánea (LC)

Es la forma clínica más común de la leishmaniasis y está causada por varias especies como *L. major*, *L. tropica* o *L. infantum* en el Viejo Mundo, o *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. braziliensis* en el Nuevo Mundo. En la leishmaniasis cutánea aparecen lesiones ulcerativas o nodulares en el sitio donde se ha producido la infección, que se suelen autorresolver entre 6 a 18 meses tras su aparición si el individuo afectado es inmunocompetente. En algunos casos, la evolución de la LC causada por *L. tropica* se complica originándose lesiones recidivantes que dan lugar a la leishmaniasis cutánea recidivante (LCR) en el 5% de los casos. En la periferia de una cicatriz aparecen microlesiones confluentes que tienden a ulcerarse, dejando una nueva cicatriz adyacente a la primitiva; la evolución es tórpida, de años, sin respuesta a la medicación. Otras complicaciones de las LC son las leishmaniasis cutáneas difusas (LCD) causadas por *L. amazonensis* (30%) con lesiones que se asemejan a la lepra lepromatosa, de evolución crónica y especialmente difícil de tratar. Las LC son enfermedades que causan estigma social, sobre todo entre las mujeres, debido a las deformidades originadas por las cicatrices o las mutilaciones de la cara.

3.1.2.2 Leishmaniasis mucocutánea (LMC)

La leishmaniasis mucocutánea (LMC) puede aparecer meses o años después de que la persona afectada haya sufrido un episodio de leishmaniasis cutánea causada por *L. braziliensis* u otras especies del subgénero Viania (5-15% de casos). Las personas afectadas sufren destrucción del tejido nasal, bucal y oro/naso-faríngeo,

causando una mutilación facial desfigurante y devastadora, y en casos extremos la muerte debido al desarrollo de sobreinfecciones. Aunque es poco frecuente, también se han descrito casos de LMC producida por *L. infantum* en individuos inmunodeprimidos.

3.1.2.3 Leishmaniasis visceral (LV)

Es la forma más grave de la enfermedad y es mortal en ausencia de tratamiento. Esta causada por *L. infantum* en los países de la Cuenca Mediterránea, Brasil y otros países de Latinoamérica, y por *L. donovani* en África oriental, India, Bangladesh y Nepal. Los órganos internos que se ven afectados son el bazo, el hígado y la médula ósea (órganos hematopoyéticos). La clínica típica cursa con pérdida de peso, fiebre, hepatoesplenomegalia, pancitopenia e hipergammaglobulinemia. Si la enfermedad progresa, el individuo afectado desarrollará caquexia, y como consecuencia de la trombocitopenia, se puede producir el sangrado de las mucosas. Debido a la leucocitopenia que presentan los pacientes aquejados con LV, se genera una severa inmunodepresión que les hace mucho más susceptibles de padecer otras enfermedades infecciosas. En ocasiones, tras la cura terapéutica de la leishmaniasis visceral, hay pacientes que desarrollan la leishmaniasis dérmica post Kala-Azar (PKDL). Se caracteriza por la aparición de lesiones nodulares, pápulas o máculas hipopigmentadas por toda la superficie de la piel. Los individuos con PKDL son los auténticos reservorios de la enfermedad, por lo que su diagnóstico y tratamiento precoz son cruciales para el control.

3.1.2.4 Co-infección *Leishmania* spp. y VIH

Desde la aparición del SIDA, la co-infección *Leishmania* spp. y VIH ha adquirido especial relevancia. En los pacientes co-infectados, además de las manifestaciones clínicas ya descritas, cuando la inmunodepresión es muy severa, es frecuente encontrar al parásito en localizaciones atípicas como tubo digestivo, pulmones, espacio peritoneal, esófago, etc. originando cuadros clínicos poco habituales. En estos pacientes, las tasas de recidivas y mortalidad suelen ser elevadas, siendo importante mantener el tratamiento anti-retroviral para reducir la progresión de la enfermedad, retrasar las recidivas y aumentar la supervivencia de los afectados.

3.1.2.5 Epidemiología

Las leishmaniasis presentan una amplia distribución mundial que está estrechamente ligada a la presencia del vector. La OMS estima que cada año se producen entre 700.000 y un millón de nuevos casos y entre 26.000 y 65.000 defunciones. Se estima también que la mayoría de los individuos infectados por *Leishmania* spp. no desarrollan ningún síntoma en toda su vida, por ello, el término leishmaniasis implica el hecho de padecer enfermedad. En 2017, el 95% de los nuevos casos de LV se observaron principalmente en 10 países: Bangladesh, Brasil, China, Etiopía, India, Kenia, Nepal, Somalia, Sur Sudán y Sudán. Mientras, la mayoría de los casos de LC ocurrieron en Afganistán, Algeria, Brasil, Colombia, Irán, Pakistán, Perú, Arabia Saudí y Siria.

Según la OMS en la región de África, la LC, LMC y LV son endémicas en Argelia y muy endémicas en los países de África Oriental, donde los brotes de LV son habituales.

En la región de las Américas, la epidemiología de la leishmaniasis es muy compleja, debido a las variaciones en los ciclos de transmisión, reservorios, vectores, manifestaciones clínicas, respuesta al tratamiento, y el solapamiento de varias especies de *Leishmania* en una misma zona geográfica. El 90% de los casos de LV de esta región se concentra en Brasil, aunque su reporte está aumentando en otros países de Latinoamérica. La LMC es frecuente en Brasil, Bolivia y Perú, y junto con Etiopía, concentran el 90% de los casos de LMC. (<http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50505/2019-cde-leish-informe-epi-americas.pdf?ua=1>).

En la región del Mediterráneo Oriental se concentra el 70% de los casos de LC del mundo. La LV es endémica en Irak, Somalia y Sudán.

En la región de Asia Sudoriental, ocurren tanto casos de LV como LC.

En Europa, tradicionalmente, el 70% de los casos de leishmaniasis se producían en niños menores de 15 años. En los años 80 su detección se incrementó en población adulta afectada por el VIH, que se redujo tras la introducción del tratamiento antirretroviral. Actualmente se considera una enfermedad emergente, se produce como brotes epidémicos y la aparición de casos autóctonos en países previamente considerados libres, se debe a cambios ambientales, al aumento latitudinal de la distribución del vector y a los movimientos y redistribución de los reservorios.

En España la leishmaniasis es endémica en todo el territorio peninsular y las islas Baleares, y está causada por *L. infantum*. España es uno de los países europeos con mayor carga de la enfermedad, la incidencia anual es de 0,45 casos/100.000 habitantes, produciéndose la mayoría de los casos en niños menores de 14 años, en adultos coinfectados por el VIH, y en pacientes con enfermedades autoinmunes sometidos a tratamiento inmunosupresor.

En el año 2009 se observó un incremento en el número de casos en el área sur de la Comunidad de Madrid. El brote en el municipio de Fuenlabrada fue un ejemplo de la urbanización de la leishmaniasis, donde animales silvestres (conejos y liebres) jugaron un papel importante en el incremento de la tasa de infección del vector y en consecuencia el aumento de la incidencia en esa área (entre julio de 2009 hasta mayo de 2015, se detectaron 644 casos, lo que supuso una incidencia de 18,91 casos por 100.000 habitantes).

3.1.3 Diagnóstico de laboratorio

Para una adecuada realización del diagnóstico del laboratorio y posterior interpretación de los resultados es importante contar con una buena información clínica y epidemiológica.

El diagnóstico de certeza de la leishmaniasis se realiza por la observación directa de los amastigotes en tejidos o aislando los promastigotes en cultivo. El diagnóstico indirecto se realiza mediante la demostración de la respuesta humoral o celular frente al parásito.

3.1.3.1 Examen microscópico y cultivo

El examen microscópico consiste en la observación directa de amastigotes de *Leishmania* spp. en extensiones de material aspirado, principalmente de nódulo linfático, médula ósea, sangre, aspirados o biopsias cutáneas, teñidas mediante métodos convencionales (Giemsa, May-Grunwald, Diff-Quick). Los amastigotes se observan en el interior del citoplasma de monocitos, neutrófilos o principalmente macrófagos o libres, como cuerpos ovalados de 2-4 μm de diámetro (Figura 1). Su especificidad es elevada pero la sensibilidad de esta técnica depende de la muestra clínica, la calidad del frotis, el número de campos visuales examinados, la carga parasitaria y la experiencia del observador.

En el caso de la LC la detección directa del parásito apenas muestra una sensibilidad del 80%, disminuyendo bastante, tanto en los casos avanzados (más de 6 meses de evolución) como en los de LMC. En el diagnóstico de LV, la detección directa puede alcanzar una sensibilidad del 90%, si bien para ello se requiere el estudio de muestras como el aspirado de bazo o médula ósea, que se obtienen mediante procedimientos invasivos, y para los que se requiere cierto grado de experiencia y buenos medios de infraestructura.

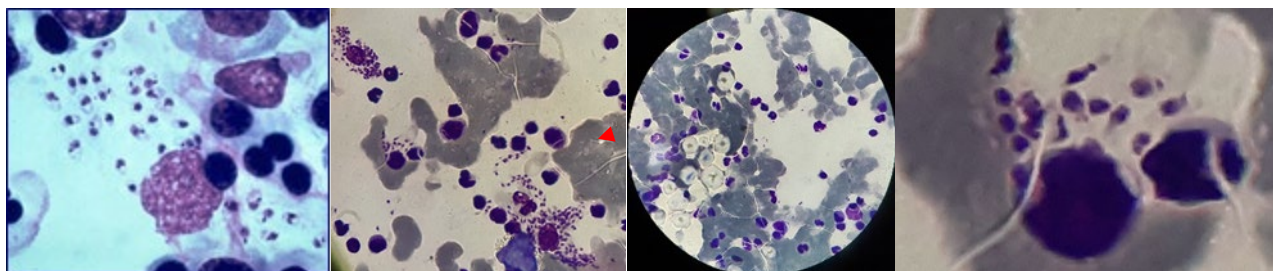


Figura 1. Amastigotes de *Leishmania* spp. en extensiones de médula ósea teñidas con Giemsa

Las técnicas de inmunohistoquímica, como la inmunoperoxidasa o la inmunofluorescencia directa de muestras tisulares, pueden ayudar a identificar o confirmar la presencia de parásitos, particularmente en órganos con baja carga parasitaria o cuando los parásitos no son identificables de forma clara mediante microscopía óptica. Se trata de métodos mucho más sensibles pero que requieren laboratorios e instalaciones especiales y personal cualificado para llevar a cabo tanto la técnica como la lectura de las preparaciones. Además, es probable la interpretación errónea dando lugar a resultados falsos positivos (los amastigotes pueden confundirse con artefactos) y a falsos negativos (la sensibilidad depende de la carga parasitaria).

El **cultivo** de una muestra permite incrementar la probabilidad de detección del parásito. El medio de cultivo más idóneo es el NNN (Novy- McNeal-Nicolle), que consiste en una mezcla de agar-sangre de conejo y antibióticos. El NNN es un medio difásico con una fase líquida proveniente del agua de condensación originada al solidificarse el medio. También se puede añadir medio líquido RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibióticos. Generalmente se añaden 100 µl de la muestra de sangre, médula ósea o cualquier otro fluido a un tubo de cultivo atemperado. En el caso de que la muestra clínica sea una biopsia de tejido, como paso previo, ésta se debe homogenizar (triturar mecánicamente) usando como diluyente NET 10 (NaCl 0,1 M; EDTA 10 mM, Tris 10 mM, pH 8). Los tubos inoculados se incuban a una temperatura de 27°C. En los cultivos, los parásitos se transforman de la forma intracelular (amastigote) a la forma extracelular (promastigote). Los cultivos se analizan semanalmente al microscopio para visualizar el parásito. Los promastigotes pueden verse a partir de la primera semana de cultivo, aunque pueden requerirse resiembras semanales en medio fresco hasta conseguir su aislamiento, durante al menos 4 semanas consecutivas (**Figura 2**). Si después de cuatro subcultivos (4 semanas), no se observan promastigotes al microscopio, el cultivo se considera negativo.

El cultivo en medios monofásicos, como el Schneider's Drosophila o RPMI 1640, es poco efectivo para el aislamiento del parásito. Estos medios son muy utilizados para la masificación una vez que el parásito se ha adaptado al cultivo.

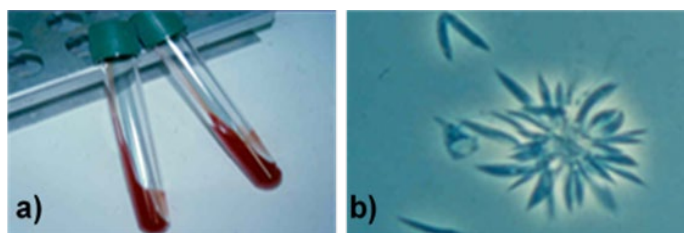


Figura 2. a) Tubos de medio NNN para aislamiento de *Leishmania* spp.; b) Promastigotes de *Leishmania* spp. en cultivo

El cultivo tiene mayor sensibilidad que la observación microscópica directa, pero es muy laborioso, requiere mayor tiempo para obtener resultados (hasta cuatro semanas si el resultado es negativo) y presenta riesgo de contaminación, ya que la toma de muestra se debe realizar asépticamente y la siembra en el medio de cultivo debe hacerse en condiciones de esterilidad. Por otra parte, el éxito dependerá de la viabilidad de los parásitos en la muestra, por ello, la muestra se debe inocular lo más pronto posible tras su toma. El cultivo es muy útil en investigación y estudios epidemiológicos que requieren el aislamiento del parásito para su posterior caracterización por otras técnicas.

3.1.3.2 Pruebas de detección de antígeno

Una de las aproximaciones de detección de antígeno es la prueba comercial KAtex (<https://clin-tech.co.uk/ifu/ifu-I3-040-katex.pdf>). Esta técnica permite detectar antígenos de *Leishmania* spp. en orina en los casos de LV. Es una prueba de aglutinación con látex y su sensibilidad está relacionada con altas cargas parasitarias y la gravedad de la LV. La orina se expone a un baño de agua en ebullición para inactivar el material inestable al calor capaz de causar una reacción falsamente positiva. El látex de la prueba, sensibilizado con anticuerpos generados contra el antígeno de *L. donovani* (glicoconjugado de bajo peso molecular 5-20 kD), se mezcla con la muestra en un portaobjetos de vidrio. La reacción se puede leer después de mezclar al menos dos minutos. El antígeno presente en la muestra provoca la aglutinación del látex sensibilizado y es indicativo de LV.

El antígeno puede detectarse desde un mes hasta seis meses después del tratamiento (Riera, Fisa et al. 2004). Su especificidad es alta, de 82-100% y una sensibilidad variable del 47-95% (Elmahallawy et al. 2014). En inmunodeprimidos, se ha reportado una sensibilidad y una especificidad de 85-100% y del 96-100% respectivamente. Su interpretación requiere personal bien entrenado.

Recientemente la FDA (*Food and Drug Administration*) ha aprobado un nuevo test para el diagnóstico *in vitro* de la LC. La prueba rápida CLDetect™ es una prueba inmunocromatográfica cualitativa basada en la detección del antígeno peroxidoxina, presente en los amastigotes. La muestra de la lesión cutánea se debe tomar con un cepillo interdental, para posteriormente ser sometido a un buffer de lisis, tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, se depositan 20 µL del lisado en la tira inmunocromatográfica. La lectura de resultados se realiza en 20 minutos (<http://inbios.com/wp-content/uploads/2016/06/CL-Brochure-06.26.15-updated-FDA-cleared.pdf>).

3.1.3.3 Técnicas serológicas

Estas técnicas permiten detectar la presencia de anticuerpos principalmente en los casos de LV, su valor es limitado en el diagnóstico de la LC, LMC y en la co-infección de *Leishmania* spp. y VIH, ya que en estos casos no se produce una elevación en los niveles de anticuerpos como en la LV.

Un elevado nivel de anticuerpos junto con un cuadro clínico compatible suele ser suficiente para establecer el diagnóstico definitivo de la enfermedad. Ante una sospecha clínica, el resultado negativo no descarta la enfermedad, en esos casos es necesario recurrir a otras pruebas.

Es importante tener presente las siguientes limitaciones: i) Los títulos de anticuerpos permanecen detectables durante varios años después de la curación, por lo que, en el caso de la LV, no permiten el diagnóstico de las recaídas. ii) Detectan infecciones asintomáticas (la seroprevalencia en población sana es <10% en áreas de moderada a baja endemidad, pero es >30% en focos de alta transmisión). iii) Existen reacciones cruzadas con otros patógenos, principalmente *Trypanosoma cruzi*, y menos clara es la reacción cruzada con otros géneros menos relacionados como *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Rickettsia*, *Toxoplasma* y *Babesia*. iv) En casos de co-infección *Leishmania* spp./VIH o estados de inmunodepresión por otras causas, la sensibilidad es baja.

Las diversas técnicas serológicas pueden realizarse en formato cualitativo (detectan la presencia o no de anticuerpos) o cuantitativo (reflejando así la cantidad de anticuerpos presentes en el suero). El formato cuantitativo permite realizar el seguimiento post-tratamiento.

Las principales pruebas serológicas son:

La **inmunofluorescencia indirecta** (IFI), es la técnica diagnóstica más empleada y se ha considerado tradicionalmente la técnica de referencia para el diagnóstico serológico de la leishmaniasis debido a su alta sensibilidad y especificidad, en la LV del 80-100% y del 90-100%, respectivamente. Sus inconvenientes son la subjetividad de la lectura y la necesidad de emplear un microscopio de fluorescencia. Esta técnica se basa en emplear como fuente antigénica una suspensión de promastigotes de *Leishmania* spp. fijados en un portaobjetos de cristal al que se añaden diluciones seriadas del suero problema. Si el suero tiene anticuerpos específicos, éstos se unirán a los promastigotes fijados. La unión de los anticuerpos específicos sobre el parásito se visualiza añadiendo un conjugado de anti-inmunoglobulinas marcado con isotiocianato de fluoresceína que se unirá a los anticuerpos ya fijados en la muestra. Posteriormente la preparación debe observarse en un microscopio de fluorescencia, apareciendo los promastigotes de color verde intenso si el suero es positivo, y rojo tenue si es negativo (**Figura 3**). No existe un acuerdo entre los laboratorios sobre el punto de corte de la técnica de IFI y puede oscilar entre 1:40 y 1:80. La especificidad es mayor si la línea de corte es 1:80. En los casos dudosos, la fiabilidad del resultado aumenta si se realizan varias determinaciones con intervalos de 30 - 45 días, en los que se observará una seroconversión.

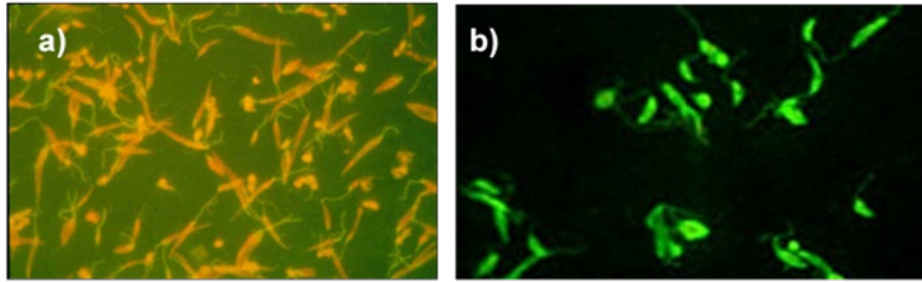


Figura 3. Inmunofluorescencia indirecta (IFI): a) Resultado negativo; b) Resultado positivo

El enzoinmunoensayo (ELISA) presenta una sensibilidad y especificidad entre 70-100% y entre 81- 100%, respectivamente. Para la realización de esta técnica se han utilizado diferentes antígenos que pueden clasificarse en cuatro grupos según su naturaleza: extractos de parásitos solubles o completos, proteínas purificadas y proteínas recombinantes. La especificidad y sensibilidad se ven afectadas por el tipo de antígeno seleccionado. Uno de los antígenos recombinantes más empleado es el antígeno recombinante rK39 de *L. chagasi*, que contiene una secuencia repetida de 39 aminoácidos y es un potente inmunógeno de linfocitos B. En este caso, el soporte sólido utilizado para fijar los antígenos son placas de 96 pocillos. Tras la incubación con el suero problema, se añade un conjugado anti-inmunoglobulinas marcado con un enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina) que en presencia del sustrato adecuado dará lugar a un producto coloreado, de manera que la intensidad del color está directamente relacionada con la concentración de anticuerpos presentes en el suero inicial. Las principales ventajas de esta técnica son la automatización, por lo tanto, permite procesar un gran número de muestras simultáneamente, y la lectura espectrofotométrica objetiva, que permite cuantificar los niveles de anticuerpos específicos sin que influya la subjetividad de la persona que está realizando el ensayo. Una variante de esta prueba es la introducción del luminol como sustrato de la peroxidasa (quimioluminiscencia). En el mercado español existe una prueba montotest basado en este principio que está diseñado para situaciones de baja carga de trabajo (<https://www.vircell.com/producto/leishmania-virclia/>).

El **test de aglutinación directa (DAT)**, emplea promastigotes completos y teñidos, bien en suspensión o en forma liofilizada y permite la detección de anticuerpos específicos frente a los antígenos de superficie de *Leishmania* spp. (Figura 4). Es un método barato, relativamente simple y de fácil manejo, muy útil en estudios de campo y en los países de bajos recursos. Su sensibilidad oscila entre el 93-97,7% y su especificidad se estima en el 95%. Una de las limitaciones de esta técnica es el periodo de incubación relativamente largo (18-24 horas). En España, esta prueba, sorprendentemente, presenta mayor sensibilidad para la detección de anticuerpos anti-*Leishmania* en pacientes co-infectados por el VIH.

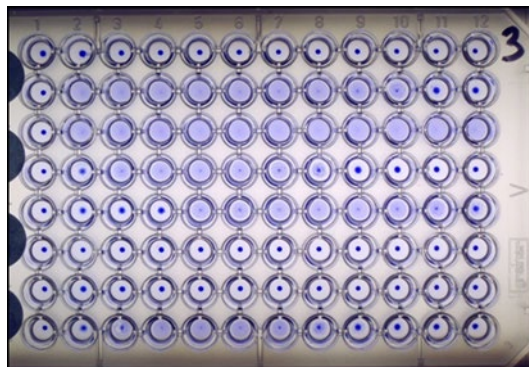


Figura 4. Resultados de una placa de DAT en el diagnóstico de leishmaniasis (formato de cuantificación)

Una variante del DAT es el test de aglutinación rápida de cribado (FAST), que combina una concentración mayor de parásito con una única dilución de la muestra, por lo que la lectura se realiza en menor tiempo (3 horas), siendo muy útil para estudiar poblaciones grandes. Se han obtenido sensibilidades y especificidades de 93,6-97,7% y 89-93%, respectivamente.

Entre las pruebas serológicas cualitativas y rápidas, destacan los **tests inmunocromatográficos (ICT) o dipsticks (Figura 5)**. Fundamentalmente se basan en el uso del antígeno rK39, en el mercado español está disponible en el formato de tiras de papel de nitrocelulosa impregnadas del antígeno. Los resultados se obtienen en 20 minutos, lo que permite una actuación inmediata, también son muy útiles en estudios de campo. Presentan una especificidad alta, pero su sensibilidad varía en función de la zona donde se realice el estudio, la sensibilidad de este ensayo es mucho mayor en la India que en los países del cuerno de África. En España, se estimó que la sensibilidad del ICT rk39 es próxima al 78% en individuos inmunocompetentes, siendo ligeramente menor en individuos que padecen la co-infección *Leishmania*/HIV. Esta prueba no presenta reacciones cruzadas con *T. cruzi* por lo que su valor predictivo positivo en ambos escenarios fue del 100%. Estos resultados apoyan a que esta prueba sea utilizada como herramienta de diagnóstico de LV en España.



Figura 5. Tes inmunocromatográfico (ICT) para el diagnóstico de *leishmaniasis* visceral.
Izquierda: resultado negativo, derecha: resultado positivo

3.1.3.4 Detección de ácidos nucleicos

La detección de ácidos nucleicos en el diagnóstico de la leishmaniasis se basa principalmente en la detección de ADN. Estas técnicas mejoran la sensibilidad diagnóstica en los casos de LC y permiten el uso de procedimientos menos invasivos para el diagnóstico de los casos de LV, como es el análisis de sangre periférica en lugar de aspirado de médula ósea, tanto en individuos inmunocompetentes como inmunodeprimidos. Para la extracción del ADN se puede utilizar cualquier tipo de muestra clínica; sangre, médula ósea o cualquier otro fluido, aspirados y raspados cutáneos, biopsias, etc. Los protocolos tradicionales de extracción pueden ser clásicos, usando soluciones orgánicas (fenol:cloroformo), kits comerciales manuales o automatizados. Este paso se debe monitorizar mediante controles tanto negativos como positivos (ajustado al límite de detección). Si se emplean sistemas automatizados es conveniente asegurarse de que la médula ósea no presente coágulos, en cuyo caso es conveniente tratar la muestra como si fuera una biopsia de tejido.

La técnica más utilizada para la detección de ADN de *Leishmania* spp. es la PCR, en formato directo, *nested* o anidado, multiplex, inverso o a tiempo real (cuantitativa). En términos de diagnóstico, las PCRs detectan ADN de cualquier especie de *Leishmania*. Para la identificación de especie se puede asociar la PCR a digestión con enzimas de restricción y análisis de fragmentos (PCR-RFLP), o la secuenciación.

Los genes diana más utilizados en el diagnóstico de la leishmaniasis son el espaciador transcrito interno-1 (ITS1), los minicírculos del kinetoplasto (kDNA), el ADN que codifica el miniexón, y el gen que codifica la subunidad pequeña del ARN ribosomal (SSUrRNA).

En el Centro Nacional de Microbiología (CNM) de España, la detección de *Leishmania* spp. se realiza mediante PCR del gen SSUrRNA (Figura 6). Este gen está presente en todas las especies de *Leishmania*, en un número entre 100 y 200 copias. La sensibilidad de esta PCR es alta debido a que está estandarizado en el formato *nested* o anidado (LnPCR), es capaz de detectar 0,01 parásitos, con una especificidad del 100%. Mediante esta metodología, la sensibilidad en el diagnóstico de LC y LMC, es próxima al 100%. En el caso de la LV, la sensibilidad usando sangre periférica se situó entre el 70 y 100%, lo que hizo que esta técnica

podiera aplicarse con mucho éxito en muestras de sangre periférica (muestra menos invasiva), incluso en casos de baja carga parasitaria.

Gracias a la tecnología de gelificación, ahora este procedimiento está disponible en un formato individualizado gelificado, listo para la adición del ADN de la muestra (LeishGel PCR). Como es una PCR convencional, los productos amplificados se visualizan mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con GelRed. Aunque el formato *nested* implica dos PCR independientes, esta técnica es muy rápida, los resultados se obtienen en 6 horas frente a las 4 semanas que requiere el cultivo.

También están desarrollados métodos basados en la tecnología de la PCR a tiempo real (qPCR). La mayoría son pruebas cualitativas que están diseñadas en las mismas dianas de las PCR convencionales. Comercialmente, todos los procedimientos emplean una sonda Taqman para la detección del producto amplificado y, comparando la señal con lo obtenido en una curva patrón, se puede indicar que la cantidad de fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de ADN inicial presente en la muestra, permitiendo así la cuantificación de la carga parasitaria en la muestra. Con este formato de PCR, el tiempo de obtención de resultados se reduce a la mitad del necesario en el formato convencional.

Como se ha mencionado anteriormente, las diferentes manifestaciones clínicas y sus posibles complicaciones dependen en buena parte de la especie del parásito responsable de las mismas, este hecho es de especial importancia cuando la infección tiene lugar en regiones donde varias especies de *Leishmania* co-existen. Una de las técnicas moleculares más empleadas para conocer la especie de *Leishmania* responsable de un cuadro clínico, es la amplificación mediante PCR del espaciador transcrito interno-1 (ITS-1) y la posterior secuenciación del producto amplificado (PCR + secuenciación). El análisis de las secuencias obtenidas permite identificar la especie de *Leishmania*, a excepción de las especies pertenecientes al subgénero *Viannia*, ya que éstas presentan una alta homología en esa región. Para subsanar esta limitación se puede emplear la amplificación por PCR y posterior secuenciación del gen que codifica la proteína de choque térmico HSP70, que permite diferenciar todas las especies de *Leishmania*, su principal inconveniente es su baja sensibilidad en muestras clínicas. Su efectividad es mayor usando material de cultivo de parásitos aislados.

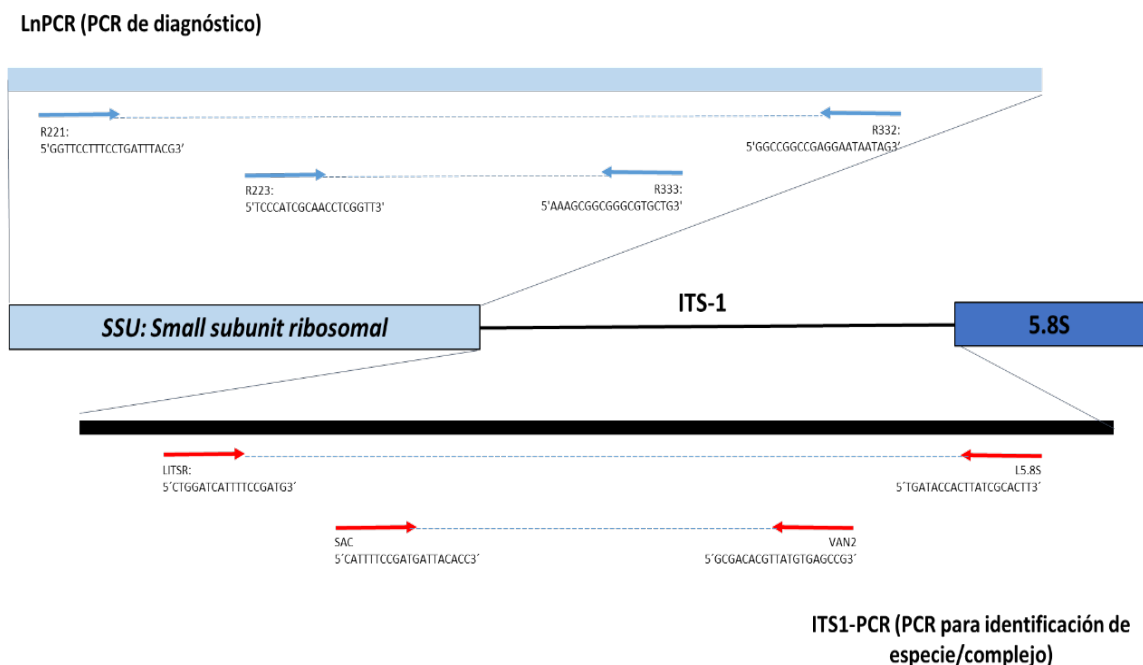


Figura 6. Esquema de las PCRs de diagnóstico y caracterización de *Leishmania* spp. que se emplean en el CNM.

Con el fin de reducir las necesidades de infraestructura, en los últimos años también se han desarrollado métodos de amplificación a temperatura constante, lo que a priori, supone una ventaja, sobre todo en áreas rurales de países en vías de desarrollo. Estas técnicas son el LAMP (*loop mediated amplification*), que amplifica el ADN del parásito (**Figura 7**), y el NASBA (*Nucleic Acid Sequence Based Amplification*), que amplifica el ARN. De momento se ha publicado la evaluación de un prototipo fabricado por una empresa japonesa empleando muestras clínicas de Colombia, Etiopía y España. Según los estudios realizados en España, los resultados de la prueba Loopamp™ *Leishmania* Detection Kit (Eiken Chemical Co.) se correlacionan adecuadamente con la LnPCR y la qPCR.

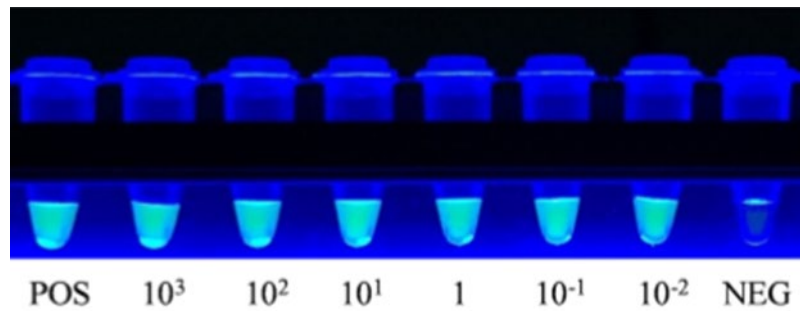


Figura 7. Límite de detección de LAMP para la detección de *Leishmania* spp.
(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5905109/pdf/13071_2018_Article_2836.pdf)

En la **Figura 8** se presenta un algoritmo de trabajo para el diagnóstico de las leishmaniasis.

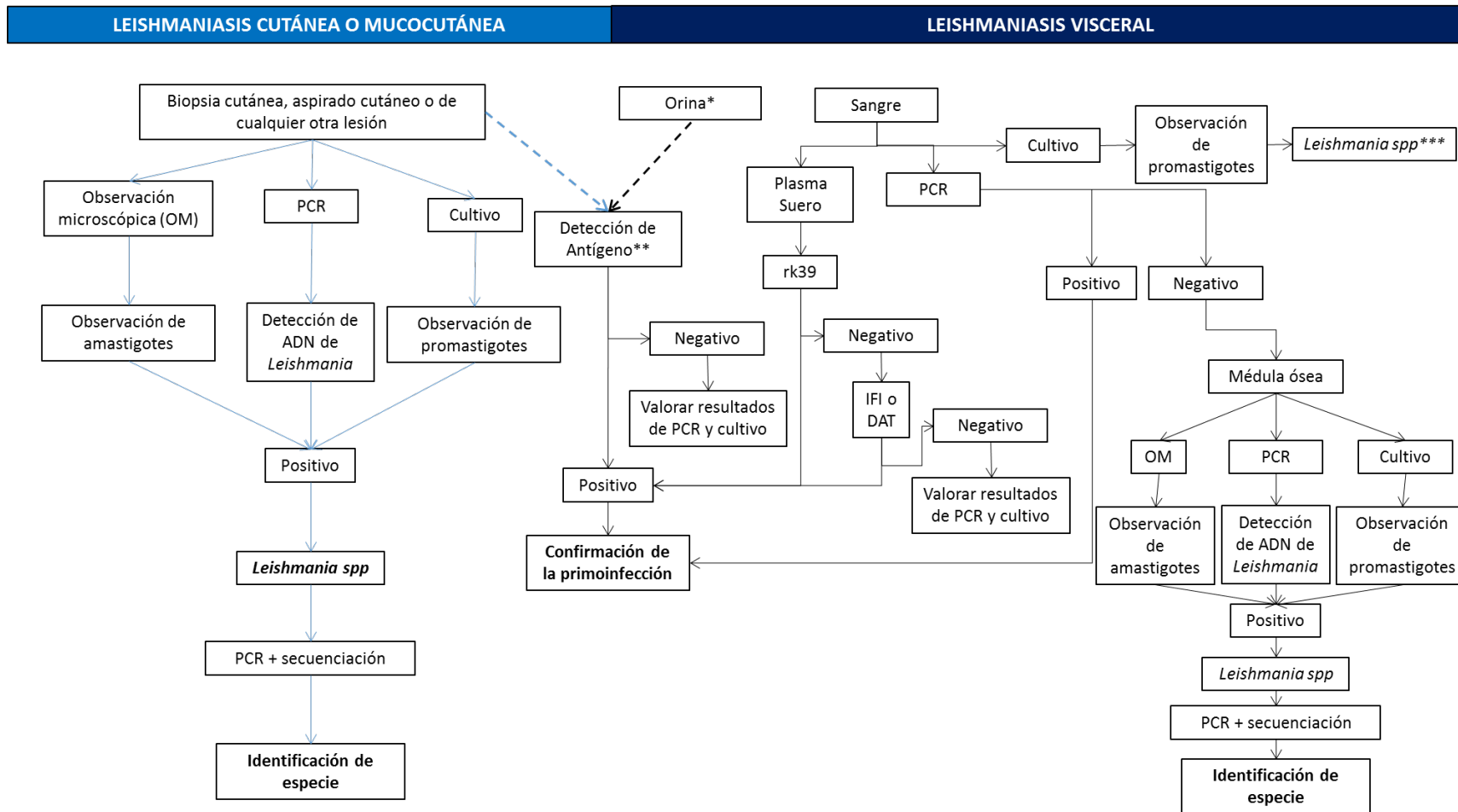


Figura 8. Sugerencia de algoritmo de trabajo para el diagnóstico de las leishmaniasis. *La detección de antígeno en orina es prescindible. **La detección de antígeno en aspirados cutáneos mediante inmunocromatografía aún no ha sido valorada en España. ***Se puede continuar hasta la identificación de la especie si el resultado es positivo

3.2 PALUDISMO

3.2.1 Características generales

La malaria es una enfermedad producida por parásitos del género *Plasmodium*, que se transmite al hombre a través de la picadura del mosquito hembra de la familia *Anopheles*, con un periodo de incubación de 12-14 días tras la picadura (hasta 28 días en el caso de *P. malariae*). La enfermedad se debe al efecto directo de la parasitación de los eritrocitos, cuya invasión supone una modificación de la membrana eritrocitaria. Esto determina una pérdida de su capacidad de deformación, tendencia a la citoaderencia y, finalmente, destrucción eritrocitaria.

Existen cinco especies que causan enfermedad en el hombre: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* (*P. ovale wallikeri* y *P. ovale curtisi*) y *P. knowlesi*. *P. falciparum* y *P. knowlesi* producen los cuadros más graves. *P. ovale* y *P. vivax* se acantonan en los hepatocitos en forma de hipnozoitos y pueden ocasionar recidivas meses después de la primera infección.

Según el último informe mundial sobre el paludismo, publicado en noviembre de 2018, en el año 2017 hubo 219 millones de casos de paludismo, en comparación con los 217 millones de 2016. La cifra estimada de muertes por paludismo en 2017 fue de 435.000, similar a la del año anterior, siendo los niños menores de 5 años el grupo más vulnerable. África soporta una parte desproporcionada de la carga mundial de paludismo, ya que el 92% de los casos y el 93% de los fallecimientos por esta enfermedad se producen en ese continente. *P. falciparum* fue el causante del 99,7% de los casos estimados de paludismo en la Región de África de la OMS, así como de la mayoría de los casos en las regiones de Asia Sudoriental (62,8%), Mediterráneo Oriental (69%) y Pacífico Occidental (71,9%). *P. vivax* es el parásito predominante en la Región de las Américas, donde es la causa del 74,1% de los casos de paludismo (**Figura 9**). (https://www.cdc.gov/malaria/travelers/about_maps.html).

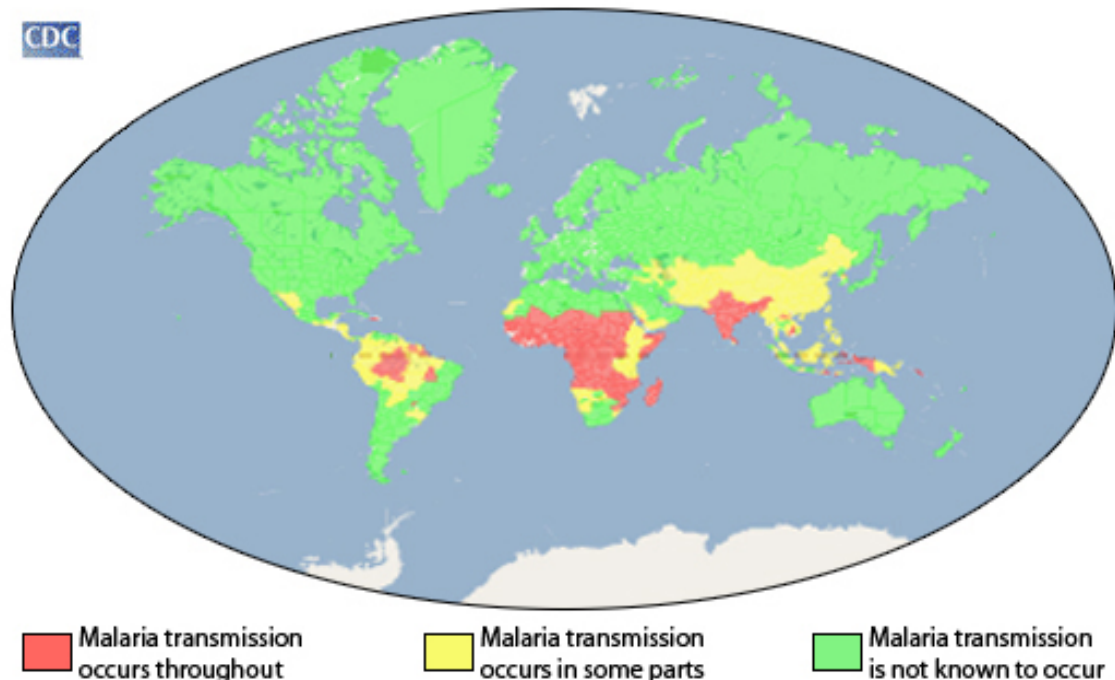


Figura 9. Regiones de transmisión de la malaria

En España, los casos diagnosticados de malaria son principalmente importados, y pueden afectar a tres grupos de pacientes:

- Viajeros a zonas endémicas que no han tenido ningún contacto previo con malaria (no inmunes) y han tomado o no profilaxis antimalárica.

- Inmigrantes procedentes de áreas endémicas. Estos pacientes se caracterizan por presentar un estado de inmunidad parcial tras infecciones previas repetidas (“semi-inmunidad”). Esta inmunidad no esteriliza la parasitemia, pero previene el desarrollo de enfermedad sintomática y grave a pesar de la presencia de parásitos en sangre. Es de corta duración y se pierde años después de no tener una exposición persistente a la infección.

- Inmigrantes que tras un periodo de tiempo viviendo en Europa, regresan a sus países para visitar a sus familiares y amigos, son denominados VFR (*visiting friends and relatives*). Estos pacientes habitualmente no toman profilaxis y la mayoría ha perdido el estado de semi-inmunidad, por lo que son un grupo de especial riesgo.

La mortalidad asociada a malaria importada en viajeros en España se sitúa alrededor del 2-3%. Se estima que menos del 30% de los viajeros a zonas palúdicas realizan quimioprofilaxis adecuada. En todo caso, hay que remarcar que la toma de profilaxis no excluye el diagnóstico de malaria, que en estos casos puede ocurrir tras periodos de incubación más largos y con una clínica más larvada.

Sea cual sea el grupo de población, se debe descartar esta enfermedad en cualquier persona con fiebre u otra clínica compatible que haya viajado o provenga de un área endémica para malaria, pues un retraso en el diagnóstico y tratamiento se asocia con un aumento del riesgo de malaria grave y muerte.

3.2.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos

Los síntomas de la malaria son malestar general, fiebre (en personas semi-inmunes puede no estar presente), cefalea, artromialgias o astenia intensa. En ocasiones el cuadro se acompaña de náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal. La fiebre puede ocurrir en forma de paroxismos, coincidiendo con la rotura de los eritrocitos y liberación de parásitos a la sangre. Los paroxismos pueden tener una periodicidad terciana (cada 48 horas) o cuartana (cada 72 horas). En casos graves, los pacientes pueden presentar *distress* respiratorio, convulsiones, *status* epiléptico e incluso coma. Esta diversidad en la sintomatología permite calificar a la malaria como la “gran simuladora”, siendo importante un alto índice de sospecha para su diagnóstico.

En la exploración física los pacientes pueden presentar ictericia, palidez mucosa y en ocasiones palpase esplenomegalia.

Entre los hallazgos analíticos se encuentran la trombocitopenia (es la alteración más frecuente, hasta en el 80-85% de casos), anemia (30% de casos), leucopenia (20% de los casos; la presencia de leucocitosis puede orientar hacia una sobreinfección bacteriana). La LDH y la bilirrubina pueden estar aumentadas y puede haber hipoglucemia. En casos graves destaca la acidosis y la elevación del ácido láctico.

3.2.3 Diagnóstico de laboratorio

El método diagnóstico de elección ante la sospecha de una malaria es el examen microscópico de sangre venosa periférica extraída en un tubo con anticoagulante (EDTA) o sangre capilar obtenida por punción digital, que permite identificar la presencia de parásitos en sangre. Además, confiere información sobre la especie de *Plasmodium*, el índice de parasitemia y el estadio en el que se encuentran los parásitos. Estos exámenes son la gota gruesa (GG) y la extensión fina o frotis. Existen también técnicas rápidas de detección de antígeno que ayudan al diagnóstico microscópico y distinguen entre infección por *P. falciparum* o no y, cada vez con más frecuencia, hay disponibles técnicas de biología molecular. La única técnica capaz de diferenciar una parasitemia asexual que esté produciendo la clínica, de restos de DNA o de antígeno, es la microscopía.

El resultado debe emitirse lo más rápido posible ya que es una enfermedad potencialmente mortal en cuestión de horas. Si no se dispone de microscopista experto en ese momento, al menos se deberá de dar el resultado del test de detección de antígeno, indicando si el paciente tiene infección por *P. falciparum* o no. En cuanto sea posible se confirmará la especie y se indicará el grado de parasitemia si es *P. falciparum*.

3.2.3.1 Examen microscópico

La microscopía, a pesar de ser la técnica más antigua, continúa siendo el *gold standard* para el diagnóstico de una malaria sintomática. La sangre debe extraerse en cuanto se sospeche la malaria, no siendo necesario

que el paciente tenga fiebre en ese momento. Se pueden requerir varias muestras para llegar al diagnóstico, ya que, aunque la primera GG es positiva en el 95% de los casos, no se puede excluir una malaria con sólo una GG negativa debido a la variación en la parasitemia. Si la primera es negativa y sigue existiendo sospecha clínica hay que realizar otra a las 12-24 horas y una tercera a las 48 horas antes de excluir el diagnóstico. La GG y las extensiones deben de realizarse en menos de 30 minutos desde que se ha extraído la sangre para evitar el deterioro de la morfología parasitaria (ver PNT-PI-01 de este procedimiento: Examen microscópico de sangre para detección de malaria).

La GG es la técnica más sensible puesto que facilita la detección de parasitemias bajas (5-20 parásitos/ μl -0,0001%), aunque es muy dependiente del observador y es importante que éste tenga experiencia. Es la primera prueba a realizar para el diagnóstico y de utilidad para evaluar la respuesta al tratamiento. La parasitemia en la GG se calcula en forma de número de parásitos/ μl (ver PNT-PI-01 de este procedimiento).

El frotis sanguíneo es 30 veces menos sensible (límite de detección: 150 - 3000 parásitos/ μl) pero más específico, ya que permite identificar la especie infectante con más facilidad que en la GG, detectar las parasitemias mixtas y evaluar el estadio de los parásitos circulantes (trofozoítos, esquizontes, gametocitos). Con el frotis se puede cuantificar la parasitemia en forma de porcentaje de hematíes parasitados. Una parasitemia > 2,5% en personas no inmunes, es un factor pronóstico para desarrollar una malaria grave, pero es importante tener en cuenta que una parasitemia baja no es sinónimo de bajo potencial de gravedad, ya que la citoadherencia y el secuestro periférico de los hematíes parasitados pueden disminuir la cantidad de parásito circulante. Si el paciente es inmigrante, la respuesta a la parasitemia depende del grado de semi-inmunidad que presente; esta población suele tolerar mejor parasitemias elevadas. Una cifra mayor al 20% es un factor de riesgo en cualquier paciente.

El cálculo de la parasitemia en *P. falciparum* es muy importante ya que tiene valor pronóstico, junto con criterios clínicos y analíticos, y ayuda a adoptar decisiones terapéuticas en cuanto a la vía de administración, tratamiento ambulatorio o no y fármaco más adecuado. Además, es útil para controlar la eficacia pos tratamiento. Además, la microscopía proporciona información de los estadios de los parásitos circulantes, muy importante en *P. falciparum*, ya que la presencia de esquizontes es indicativa de riesgo de malaria grave, así como la presencia de polimorfonucleares con pigmento malárico visible.

Para poder diferenciar la especie de *Plasmodium* es importante conocer las diferentes características morfológicas de cada una de ellas (ver **Tabla 1**).

P. falciparum: en la sangre periférica generalmente sólo se ven trofozoítos jóvenes y gametocitos que no generan alteraciones morfológicas a los eritrocitos infectados, a pesar de ser capaces de infectarlos por más de un parásito. Los trofozoítos son pequeños, en forma de un fino anillo, son frecuentes las formas accolées (en el borde del hematíe) y pueden observarse parasitemias elevadas (hasta 20% o más), ya que esta especie es capaz de infectar cualquier tipo de hematíe. Los esquizontes contienen de 16 a 24 merozoítos y los gametocitos son fusiformes, con una forma de banana inconfundible con el resto de especies.

P. vivax: a diferencia de *P. falciparum* podemos encontrar todos los estadios del parásito en sangre periférica. Tienen tendencia a infectar a los reticulocitos, por lo que los hematíes parasitados son más grandes y poseen unas granulaciones llamadas puntos de Schüffner, además, por eso las parasitemias no suelen ser mayores al 2%. Los trofozoítos tienen un citoplasma amebode característico, los esquizontes tienen de 14 a 20 merozoítos y los gametocitos son redondos y más grandes que los de otras especies.

P. ovale: se observan también todos los estadios del parásito en las infecciones. Los hematíes infectados presentan el punteado de Schüffner y son ovalados y alargados con bordes generalmente irregulares. También infecta reticulocitos principalmente, produciendo parasitemias del 2% como máximo. El trofozoito es también amebode, pero a diferencia de *P. vivax* no es tan grande. Los esquizontes contienen de 6 a 12 merozoítos y los gametocitos son redondos u ovalados.

P. malariae: es frecuente observarlo en coinfecciones con *P. falciparum* y tiene un periodo de incubación bastante más largo (de 28-30 días). Los hematíes infectados no se agrandan y no suelen tener punteado, salvo en

excepciones que se observan los puntos de Ziemann. La parasitemia suele ser baja porque esta especie sólo infecta eritrocitos maduros. Los trofozoitos a veces toman una forma en banda característica, los esquizontes poseen de 8 a 12 merozoítos que se disponen en roseta alrededor de un acúmulo de pigmento malárico. Los gametocitos son redondos y difíciles de distinguir de trozoitos maduros.

P. knowlesi: las formas de anillo del trofozoito inmaduro son similares a las de *P. falciparum*, mientras que los trofozoitos maduros, esquizontes y gametocitos son indistinguibles de *P. malariae*. Una microscopía en la que se vean por tanto formas en anillo características de *P. falciparum*, con anillos finos con doble cromatina, y con 2 o 3 parásitos por hematíe, junto con formas en banda o aspecto de ojo de pájaro de trofozoítos maduros y esquizontes con un número de merozoítos algo más elevado que en *P. malariae* (alrededor de 16), ha de hacer sospechar una infección por *P. knowlesi*. Por tanto, todo paciente con un diagnóstico microscópico de *P. malariae* que proceda de una zona donde *P. knowlesi* sea endémico se tratará por vía parenteral cuando presente paludismo grave o parasitemia elevada. Aun así, la única forma de diagnosticar esta especie con fiabilidad es mediante una técnica de PCR específica.

Tabla 1. Características diferenciales de las especies de *Plasmodium*

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>
Tamaño del eritrocito	No agrandado	No agrandado o más pequeño	Más grande	Más grande
Forma del eritrocito	Redondo	Redondo	Redondo	Ovalado, con borde deflecado
Color del eritrocito	Normal	Normal	Pálido	Pálido
Punteado	Grietas de Maurer (puntos rojos y grandes), sólo en trofozoitos maduros	Raramente y difíciles de ver (puntos de Ziemann)	Punteado de Schüffner (muchos y pequeños)	Punteado de Schüffner (muchos y pequeños)
Trofozoíto joven	Anillo fino, delgado, dos puntos de cromatina, formas <i>accolée</i>	Compacto, cromatina grande, a veces en el centro del citoplasma.	Ameboide, citoplasma grande	Citoplasma grande, a veces con prolongaciones, cromatina gruesa
Trofozoíto maduro	Citoplasma más compacto, hemozoína oscura. Raros en sangre periférica	Formas en banda, citoplasma más compacto y cromatina más grande	Ameboide, citoplasma grande, hemozoína amarillenta	Citoplasma grande, ameboide, hemozoína amarillenta
Esquizonte	De 16 a 24 merozoítos, no suelen verse en sangre periférica	De 6 a 12 merozoítos con núcleo grande rodeando un pigmento de hemozoína oscura	De 14 a 24 merozoítos, llenando casi todo el hematíe	De 6 a 12 merozoítos, hemozoína
Gametocito	Forma de banana	Redondo y compacto, ocupa todo el hematíe. Hemozoína dispersa	Redondo y compacto. Ocupa casi todo el eritrocito.	Redondo y compacto, abundante punteado en la periferia

3.2.3.2 Pruebas de detección de antígeno

Existen diferentes técnicas de detección de antígeno comercializadas en formato de inmunocromatografía en una tira de nitrocelulosa o en tarjeta que posee bandas de anticuerpos monoclonales específicos frente al antígeno que se busca. La mayoría detectan un antígeno específico de *P. falciparum* (proteína rica en histidina 2: HRP-2 producida en grandes cantidades sólo por *P. falciparum*) y otro común a todos los *Plasmodium* (pan-aldolasa o pan-LDH), con una banda para cada uno de estos antígenos. La positividad de las dos bandas (HRP-2 y aldolasa o LDH) indica infección por *P. falciparum* sin poder excluir infección mixta con otras especies. Una única banda a nivel de la aldolasa o LDH descarta infección por *P. falciparum* y la malaria será debida a otras especies de *Plasmodium*. También hay tests que detectan una LDH específica de *P. falciparum* (P. f-pLDH) y otra específica de *P. vivax* (P.v-pLDH). En cualquier caso, será necesario una GG/frotis para identificar la especie o especies infectantes y para calcular la parasitemia.

La sensibilidad varía en función del test, de la especie y del grado de parasitemia (más baja con parasitemias < 100 parásitos/ μ L, aunque también se han descrito falsos negativos con parasitemias muy elevadas por el fenómeno de prozona). En cuanto a la especie, las mejores cifras de sensibilidad se han descrito para *P. falciparum* (93,5-96,2%), son menores para *P. vivax* (77,4-97,2%) y muy variables para el resto de especies: *P. ovale* (5,5-86,7%) y *P. malariae* (21,4-45,2%). Hay muy pocos estudios que evalúen su utilidad para *P. knowlesi*.

Es importante recordar que un test negativo no descarta una malaria, fundamentalmente si es debida a una especie distinta a *P. falciparum*. Hay diferentes estudios en marcha para el desarrollo de tests que detecten *Plasmodium knowlesi* y *P. ovale* con fiabilidad.

Se han descrito falsos positivos en presencia de factor reumatoide y anticuerpos heterófilos, también se han descrito casos aislados de falsos positivos con dengue, toxoplasma, VHC, tuberculosis y otros parásitos (tripanosomiasis, *Schistosoma* spp., *Leishmania* spp.), principalmente con los anticuerpos monoclonales frente a HRP-2. La tasa de falsos positivos es mayor con el antígeno específico de *P. falciparum* (3-32%), que para la detección de *P. vivax* (5-15%). En mujeres embarazadas, debido al secuestro de los parásitos en la placenta, la sensibilidad de la detección de antígeno puede estar disminuida.

Se han descrito falsos negativos en la detección de HRP-2 por la existencia de cepas de *P. falciparum* que no la expresan por una delección en el gen *pfhrp2*. En África se han descrito porcentajes altos de estas cepas, observando hasta un 62% de cepas con esta delección en Eritrea y un 29% en Ghana. También se han descrito estas cepas en India y en Sudamérica, fundamentalmente en Perú. Algunas de estas cepas pueden dar positivas en el test si presentan la HRP-3, por presentar epítomos similares (sobre todo si la parasitemia es alta), o pueden ser detectadas por la otra línea del test, si la tiene (pan-LDH o aldolasa). También se ha descrito cepas con la delección de los dos genes (*pfhrp2* y *pfhrp3*), por lo que el uso de estos tests no sería útil en lugares donde haya un porcentaje importante de estas cepas. Hasta el momento se han descrito pocos casos, pero son necesarios más estudios para conocer su prevalencia real.

Estos tests no son útiles para el seguimiento post-tratamiento, puesto que, aunque la LDH y la aldolasa negativizan tras el tratamiento, la proteína específica de *P. falciparum* puede persistir positiva varias semanas (35 días de media) después del tratamiento. Por este motivo si que puede ser útil para confirmar un diagnóstico retrospectivo de una persona ya tratada previamente. La LDH y la aldolasa pueden dar positivas si circulan gametocitos en sangre y dar un falso resultado de fracaso terapéutico.

Su principal ventaja es que son tests fáciles de realizar, rápidos, reproducibles y no requieren microscopio ni entrenamiento específico, pero deberían completarse siempre que sea posible con una GG y un frotis. La OMS recomienda su uso siempre antes de tratar una malaria, fundamentalmente en áreas endémicas donde no se tenga acceso a la visión microscópica por una persona con experiencia o a técnicas más complejas de biología molecular. En áreas no endémicas puede ser útil de apoyo a la microscopía y cuando no haya microbiólogo de guardia a la espera de la confirmación microscópica.

Como inconvenientes, no se recomienda su uso para sospechas de infección por *P. ovale*, *P. malariae* ni *P. knowlesi* por su baja sensibilidad. No deben de usarse de seguimiento post-tratamiento, no son cuantitativos y no distinguen los gametocitos del resto de los estadios.

Hasta la fecha la FDA sólo ha aprobado el *kit BinaxNOW® Malaria (Alere)* para su uso en el diagnóstico en USA. Este test detecta, en formato de tarjeta, la HRP2 y aldolasa en líneas diferentes, diferenciando por tanto si la infección es por *P. falciparum* o si es por una especie no-*falciparum*. Para la detección de *P. falciparum* la sensibilidad analítica fue de 95,3% [intervalo de confianza (IC) del 95%: 93-97%] y la especificidad analítica fue 94,2% [IC 95%: 93-95%]. Para la detección de *P. vivax* la sensibilidad analítica fue de 68,9% [IC 95%: 66-72%] y la especificidad analítica fue 99,8% [IC 95%: 99-100%]. Para la detección de infecciones mixtas con *P. falciparum* y *P. vivax*, la sensibilidad analítica fue de 94,1% [IC 95%: 81-98%]. Para la detección de *P. malariae* la sensibilidad analítica fue de 43,8% y para la detección de *P. ovale* la sensibilidad analítica fue de 50,0%. Es por ello que no se recomienda su uso cuando se sospechen estas especies.

Otros test disponibles en el mercado son:

CareStart Malaria Pf/Pv Combo Test (AccessBio Inc, NJ, USA): muy buenos resultados para *P. vivax*: 99,9% (IC 95%: 98,8–100%) de sensibilidad y 99,9% (IC 95%: 98,8–100%) de especificidad. Para *P. falciparum*: 99,7% (IC 95%: 97,1–100%) de sensibilidad y 97,8% (IC 95%: 94,7–99,1%) de especificidad. Muy útil para diferenciar infecciones mixtas por estas dos especies, en algunos estudios se ha visto que con mayor sensibilidad que la microscopía (16% vs 58%). En otro estudio realizado en una zona de baja prevalencia en Etiopía, la sensibilidad obtenida fue bastante menor (87,5% para *P. falciparum* y 92,8 para *P. vivax*).

Test NADAL Malaria Pf/Pan Ag 4 especies: HPR2 y p-LDH. Sensibilidad del 99,7% y especificidad de 99,5% para *P. falciparum* comparado con la microscopía, y 95% y 100% respectivamente para el resto de especies. Inmunoquick Malaria +4: sensibilidad y especificidad con respecto a microscopía: 70,5% y 100% respectivamente para la pLDH y 98,8%, y 100% para la HPR2 respectivamente.

SDBioline AgPf/Pan, SDBioline AgPf/Pv, Biomerieux

Hay nuevos tests en desarrollo que combinan la aldolasa y la LDH aumentando la sensibilidad de detección sobre todo para *P. vivax*.

3.2.3.3 Técnicas serológicas

Existen diferentes procedimientos serológicos disponibles que se usan sobre todo para fines epidemiológicos o en bancos de sangre para la detección de donantes infectados con bajas parasitemias. También se utilizan como criterio diagnóstico para la esplenomegalia malárica hiperreactiva. Pueden permanecer positivas hasta aproximadamente un año después de completar el tratamiento, por lo tanto, no son útiles para el diagnóstico de un caso agudo. Se han visto reacciones cruzadas con *Babesia* spp.

La más usada tradicionalmente es la inmunofluorescencia indirecta (IFA), pero debido a su subjetividad está siendo reemplazada por técnicas de ELISA.

3.2.3.4 Detección de ácidos nucleicos

Las nuevas técnicas moleculares están emergiendo como el posible nuevo *gold standard*. Existen disponibles técnicas a tiempo real específicas de especie que detectan parasitemias muy bajas (desde 5 parásitos/μl hasta parasitemias tan bajas como 0,01 parásitos/μl) con una sensibilidad y especificidad cercanas al 100%. Son de gran utilidad principalmente para la confirmación de especie, para el diagnóstico de infecciones mixtas y para el diagnóstico de infecciones submicroscópicas en pacientes semi-inmunes. Sin embargo, no distinguen entre parásitos viables y no viables, ni permiten evaluar el estadio en el que se encuentran los parásitos. Además, son técnicas más caras y generalmente su tiempo de respuesta es mayor.

Es la única técnica diagnóstica útil para la detección de *P. knowlesi*, ya que esta especie es muy difícil de distinguir microscópicamente de *P. malariae* o *P. falciparum*. Además, puede ser útil para estudio de genes de resistencia.

Generalmente la diana de amplificación es la subunidad 18S del ARNr. Hay disponibles diferentes técnicas: nested-PCR y PCR a tiempo real. En el Centro Nacional de Microbiología en el Instituto de Salud Carlos III se realiza una nested-PCR (Biomalar gel Form Kit, Biotools), en la que se realiza primero una PCR específica de género y luego una segunda a partir de la primera PCR para identificar las diferentes especies. Ambas reacciones se basan en el modelo multiplex, en la primera PCR además de amplificar *Plasmodium* spp. amplifica una secuencia del ADN genómico humano (control interno) que permite monitorizar los problemas de inhibición. En la segunda PCR, se identifican a la vez infecciones únicas o mixtas por cualquiera de las 4 especies más frecuentes de *Plasmodium*. Si esta segunda PCR es negativa siendo la primera positiva y el paciente procede o estuvo en Asia, se realiza una nueva PCR para la detección de *P. knowlesi*. Al ser una técnica compleja, solo se realiza en centros de referencia y por personal altamente cualificado. Las PCRs a tiempo real tienen la ventaja de ser más rápidas, el riesgo de contaminación se reduce por estar asociado a

sistemas automatizados de extracción. En los últimos años los costes de la técnica son más bajos, pero aún siguen siendo más caras que la nested-PCR.

Hay comercializadas diferentes PCRs, algunas que detectan *Plasmodium* spp. y otras que diferencian las cinco especies de *Plasmodium*. Hasta la fecha en España hay dos casas comerciales que disponen de este producto: Altona y Fastrack Diagnosis.

RealStar® Malaria *Plasmodium* spp. PCR Kit 1.0 (Altona). Para la detección de ADN específico de *Plasmodium* spp., la sensibilidad analítica es de 1,27 copias/μl (95% de IC: 0,57 - 5,42 IU/μl). En cuanto a la especificidad analítica, no mostró reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes virus: virus BK, Dengue, Epstein-Barr, hepatitis A, B, C y E, herpesvirus humano 6A, 6B, 7 y 8, eritrovirus humano B19, virus de la inmunodeficiencia humana 1, virus del herpes simple 1 y 2, Influenza A y B, virus JC, Varicela-zóster y West Nile. Tampoco mostró reacciones cruzadas con los siguientes parásitos: *Leishmania infantum*, *L. major*, *L. donovani*, *Trypanosoma cruzi* y *Toxoplasma gondii*.

RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 (Altona). Para la detección de ADN de *P. falciparum* la sensibilidad analítica es de 0,80 copias/μl (95% IC: 0,44-2,45 copias/μl), para *P. vivax* de 0,73 copias/μl (95% IC: 0,46-1,62 copias/μl), para *P. ovale* de 1,46 copias/μl (95% IC: 0,89-3,28 copias/μl), para *P. malariae* de 0,36 copias/μl (95% IC: 0,24-0,74 copias/μl) y para la detección de ADN de *P. knowlesi*, la sensibilidad analítica es de 2,35 copias/μl (95% IC: 1,37-5,55 copias/μl).

RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0. No mostró reactividad cruzada con ninguno de los siguientes virus: virus Chikungunya, Dengue, Influenza A y B y West Nile. Tampoco mostró reactividad cruzada con los siguientes parásitos: *Babesia microti*, *Leishmania donovani*, *L. infantum*, *L. major*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* y *T. brucei*.

También hay técnicas de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP), que detectan *Plasmodium* spp. con un límite de detección de 2-5 parásitos/μl en una hora, son más baratos y requieren una infraestructura más sencilla; además se ha visto que detecta *P. knowlesi* con una sensibilidad alta. Para *P. falciparum* tiene resultados también comparables a la PCR: sensibilidad del 100% (95% CI: 92,4–100%) y especificidad del 100% (95% CI: 97,7–100%). Tiene un gran potencial de uso para las especies que no pueden ser detectadas fácilmente por tests rápidos, y es especialmente útil en países endémicos donde no disponen de microscopía ni de posibilidad de disponer de PCRs convencionales.

Malaria sin criterios de gravedad: entre el 3º y el 7º día tras el inicio del tratamiento, dependiendo de si éste se ha realizado con artemisininas o no, se realizará una GG para confirmar la negativización (desaparición de las formas asexuadas), ya que si es positiva en este momento se considera que la malaria es resistente al tratamiento. La presencia de gametocitos en la GG no indica mala respuesta microbiológica, ya que éstos pueden persistir hasta un mes después del tratamiento. A los 28 días se debe realizar una nueva GG de control para descartar recrudescencia, aunque la GG del 3º o 7º día fuera negativa.

Malaria grave: se debe realizar GG a las 12, 24 y 48 horas hasta su negativización. En casos de malaria grave se han descrito aumentos paradójicos de la parasitemia en las primeras 12-24 horas tras el tratamiento debido a que el tratamiento no inhibe la liberación de los merozoítos por los esquizontes circulantes, pero la elevación más allá de las 36-48 horas sí indica fracaso terapéutico. Si la parasitemia no disminuye en al menos un 25% de la inicial a las 48 horas o si no se ha conseguido una eliminación total de las formas asexuadas entre el 3º y 7º día se considera fracaso terapéutico y se debe cambiar el tratamiento. En caso de emplear artesunato intravenoso para el tratamiento, se debe descartar el desarrollo de hemólisis durante las primeras 4 semanas tras finalizar dicho tratamiento, mediante la realización de hemograma, LDH y frotis de sangre periférica. Después del alta hospitalaria se deberá citar al paciente a los 7 y 28 días post-tratamiento para confirmar que no exista una recrudescencia. En la **Figura 10** se presenta un algoritmo de trabajo para el diagnóstico de laboratorio de malaria y en la **Tabla 2** se indican las características de las principales técnicas para el diagnóstico de malaria.

Figura 10. Algoritmo de trabajo para el diagnóstico de laboratorio de malaria. *En casos con RDT/GG/extensión negativa, alta sospecha clínica, antecedente epidemiológico y estancia en España inferior a 5 años se realizará la RT-PCR spp por si fuera una malaria submicroscópica.

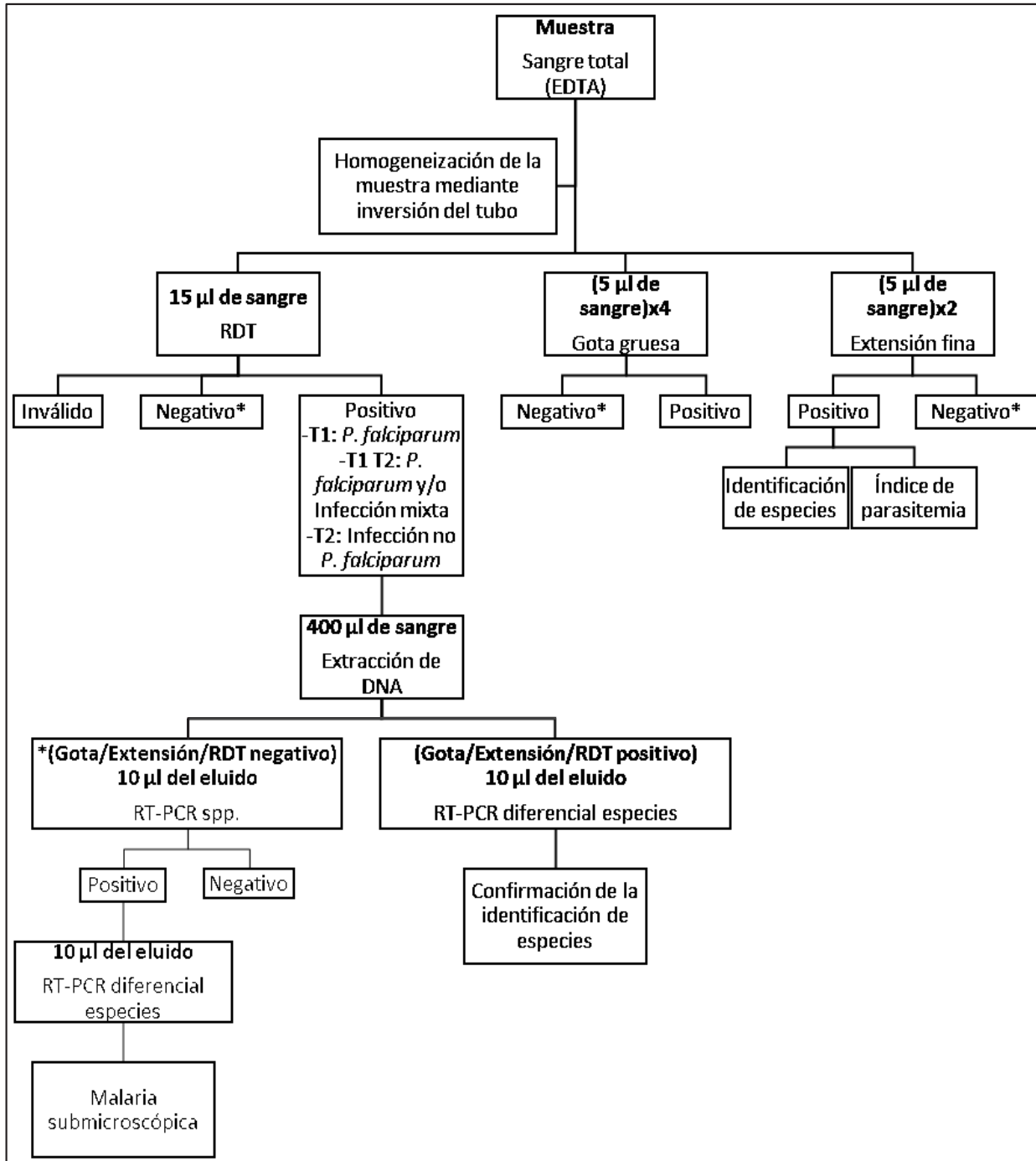


Tabla 2. Características de las principales técnicas para el diagnóstico de malaria

Método	Uso	Ventajas	Desventajas
Microscopía	<i>Gold standard</i>	Permite detectar parasitemias bajas y dar la especie. Permite calcular la parasitemia. Se puede usar para el seguimiento post-tratamiento. Barato. Más sensible que ICT	Subjetivo. Requiere personal experto. Menos sensible que PCR. La identificación de especie puede ser difícil cuando la parasitemia es baja. Las infecciones mixtas pueden perderse.
ICT	<i>Screening</i> rápido a la espera de otras técnicas. Diagnóstico presuntivo de <i>P. falciparum</i> .	Rápido. Menos subjetivo que la microscopía. No requiere casi formación.	No fiable para especies no- <i>falciparum</i> . Menos sensible que microscopía y que la PCR. Necesaria la confirmación por otros métodos. Más caro que la microscopía. No cuantitativo. No útil para seguimiento post-tratamiento. Falsos negativos con parasitemias bajas y delecciones de HPR2.
PCR	Confirma especie. Infecciones mixtas. Infecciones submicroscópicas.	Técnica más sensible. No subjetiva. Requiere menor formación que la microscopía. Permite la detección de mutaciones de resistencia.	Cara. Método complejo. No disponible en todos los medios. Cuantificación puede no correlacionarse con la microscopía. No tan útil como la microscopía para evaluación postratamiento.
Serología	Estudios epidemiológicos. Síndrome de esplenomegalia tropical. <i>Screening</i> en donantes de sangre. Personas con sospecha de malaria pero con pruebas repetidamente negativas.	Permite diagnóstico retrospectivo.	No útil para diagnóstico de caso agudo. No diferencia entre infección actual o pasada. No fiable para identificación de especie. Sólo disponible en centros de referencia.

3.3 ENFERMEDAD DE CHAGAS O TRIPANOSOMIASIS AMERICANA

3.3.1 Características generales

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una infección parasitaria causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Se describió por primera vez en 1909 por Carlos Chagas en Brasil. Mientras realizaba sus labores para el control y prevención de la malaria, un ingeniero le comentó que existían unos insectos que picaban a las personas que habitaban en esa región. Carlos Chagas al realizar la disección de esos insectos observó unos flagelados similares a los tripanosomas que causaban la enfermedad de sueño. Realizó varios experimentos en modelos animales antes de detectar esos mismos flagelados en una niña, conocida en el mundo de Chagas como Berenice. La niña que presentó síntomas similares a los de la malaria, no recibió ningún tratamiento específico para eliminar esos flagelados. La historia menciona que el cuadro clínico de la niña remitió, que fue nuevamente examinada 80 años más tarde, y que murió a causa de su envejecimiento. Antes de su fallecimiento, se pudo constatar que continuaba infectada, y se aislaron los parásitos responsables de su infección. Hoy en día se puede encontrar varios estudios realizados con esos parásitos, es decir con la cepa Berenice.

En zonas endémicas la principal vía de transmisión es la vectorial. Los insectos hematófagos de la familia *Reduviidae* parasitados, transmiten la infección por las deyecciones que realizan cuando se alimentan de sangre. El acto reflejo de rascado lleva los parásitos, que están en las deposiciones (heces u orina del redúvido), hasta el punto de la lesión ocasionada por la picadura del insecto y/o hasta las mucosas u otras abrasiones de la piel.

En las últimas décadas, ha adquirido gran relevancia la transmisión por vía oral, aumentó la detección de casos por consumo de alimentos y bebidas contaminados con las deyecciones del insecto vector, secreciones anales

de las zarigüeyas (*Didelphis*) e ingesta de carne poco cocinada de mamíferos infectados. Esta vía se pone de manifiesto principalmente como brotes, ocurre con frecuencia en el Amazonas y en los últimos años en Venezuela.

En áreas urbanas y en los países no endémicos las vías alternativas de transmisión son:

i) La vertical o congénita, de similar incidencia tanto en zonas endémicas como no endémicas, puede ocurrir durante el embarazo o en el momento del parto.

ii) La transfusional, siendo las plaquetas, la principal fracción que causó la mayoría de los últimos casos de Chagas transfusional. Las plaquetas se conservan en condiciones idóneas para mantener la viabilidad de *T. cruzi* y se administran tras una semana de su obtención, estos factores sumados a la inmunodepresión del receptor, facilitan la transmisión.

iii) Por trasplante de órganos sólidos y

iv) Por accidentes de laboratorio, principalmente por el manejo de agujas en el momento de la inoculación de parásitos en animales de experimentación.

Se considera que *T. cruzi* engloba a 7 genotipos conocidos como DTUs (unidades discretas de tipificación): TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI y TcBat. De momento, no hay suficiente evidencia que sustente su papel en la evolución clínica.

Existe otra especie de tripanosoma el *Trypanosoma rangeli* también endémico en América, que parasita humanos, pero no se considera patógeno.

3.3.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos

En la evolución clínica de la infección por *T. cruzi* se distinguen dos fases: una aguda y otra crónica, las manifestaciones son diversas y dependen de la interacción entre el parásito y la respuesta inmune del individuo infectado.

3.3.2.1 Fase aguda

Después de la invasión parasitaria, el periodo inicial de la infección puede durar desde dos semanas (cuando se adquiere la infección a través de las heces contaminadas del vector), hasta varios meses (cuando se adquiere el parásito a través de una transfusión sanguínea). En general en esta etapa, los signos clínicos y síntomas son muy inespecíficos, confundiendo en muchas ocasiones con un resfriado común. Se reportan signos y síntomas sólo en el 1-5% de los infectados.

En zonas endémicas, los signos clásicos según el sitio de inoculación, son el **signo de Romaña** y el **chagoma de inoculación**. El signo de Romaña es una reacción inflamatoria conjuntival indolora, con edema bpalpebral unilateral y linfadenitis de los ganglios preauriculares, que se resuelve transcurridos entre 30 y 60 días. El chagoma de inoculación es una reacción cutánea con edema e induración local, congestión vascular e infiltración celular, seguida de linfadenitis regional.

En los casos de infección por transfusión o trasplante de órganos, la **fiebre** es la manifestación más característica. La gravedad de la infección durante el periodo inicial depende de la capacidad de la respuesta inmune del receptor para controlar la multiplicación de los parásitos. La mayoría de los casos fatales está asociada a estados previos de inmunodepresión por otras patologías de base, o por el tratamiento inmunosupresor.

En los casos de transmisión vertical destacan el bajo peso al nacer, la hepatoesplenomegalia y el distrés respiratorio, si bien el 95% de los niños infectados nacen asintomáticos. También suelen observarse cuadros de miocarditis que remiten de forma favorable y espontánea en la mayoría de los casos después de 4 a 8 semanas, aunque en niños menores de 3 años puede ser mortal (>3%). Menos común es la meningoencefalitis, que en el 50% de los pacientes puede ser fatal, se observa principalmente en casos congénitos y en individuos co-infectados con el VIH. Durante esta etapa, la parasitemia es elevada y generalmente disminuye después de unos pocos meses

dependiendo de la vía de infección y el inóculo. Como en otras infecciones, se produce una activación celular policlonal, por lo que los anticuerpos se caracterizan por su alta avidéz, aunque baja especificidad.

3.3.2.2 Fase crónica

Una vez superada la etapa aguda, y si el individuo infectado no ha sido tratado, la infección se cronifica, siendo asintomática durante décadas o de por vida, forma indeterminada de la infección. Esta forma se observa aproximadamente en el 50–70% de la población infectada. Transcurridos 20, 30 ó más años, el 30–50% de los infectados evolucionan a las formas sintomáticas. Las alteraciones que se presentan pueden ser de diferente grado y se agrupan según los órganos o sistemas afectados en: forma cardiaca, formas digestivas (megaesófago y megacolon) y formas neurológicas. En ocasiones se puede producir la muerte súbita de los afectados. En esta etapa, la persistencia de anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* es patente y la parasitemia variable, intermitente e incluso indetectable (**Figura 11**).

La forma cardiaca se caracteriza por una miocardiopatía dilatada con bloqueo parcial o completo de rama derecha, que ocasiona arritmias e insuficiencia cardiaca, siendo la fibrilación ventricular el mecanismo más frecuente de muerte súbita. La forma digestiva se caracteriza por la aparición de megavisceras, si el esófago es afectado se presenta el megaesófago que más tarde puede ser la causa de la cardiopatía por compresión.

Por otra parte, si el colon está afectado aparecerán trastornos de estreñimiento crónico, cólicos y dificultad en la evacuación, todos, síntomas secundarios de un megacolon chagásico. En las formas neuronales se observa deterioro sensorial (parestias, hipoestias táctiles y nociceptivas, sensibilidad vibratoria y de posición) y disminución de los reflejos tendinosos. Las alteraciones neuronales son más frecuentes en pacientes inmunocomprometidos. En algunos casos los parásitos pueden alcanzar el sistema nervioso central ocasionando cuadros de meningitis.

3.3.2.3 Reactivación aguda

La co-infección con el VIH, como en otras parasitosis, ha modificado la evolución natural de *T. cruzi*. Muchos individuos co-infectados sufren un proceso similar al descrito en la fase aguda, reactivación aguda. Tras la disminución de las células CD4+, la parasitemia se eleva, alcanza una distribución sistémica y puede conducir a formas clínicas de gravedad, destacando las meningoencefalitis (chagoma cerebral) y el fallo multiorgánico.

También se pueden observar situaciones de reactivación aguda tras el trasplante realizado en un receptor de órganos seropositivo para la infección por *T. cruzi*. La tasa de multiplicación de los parásitos aumenta debido

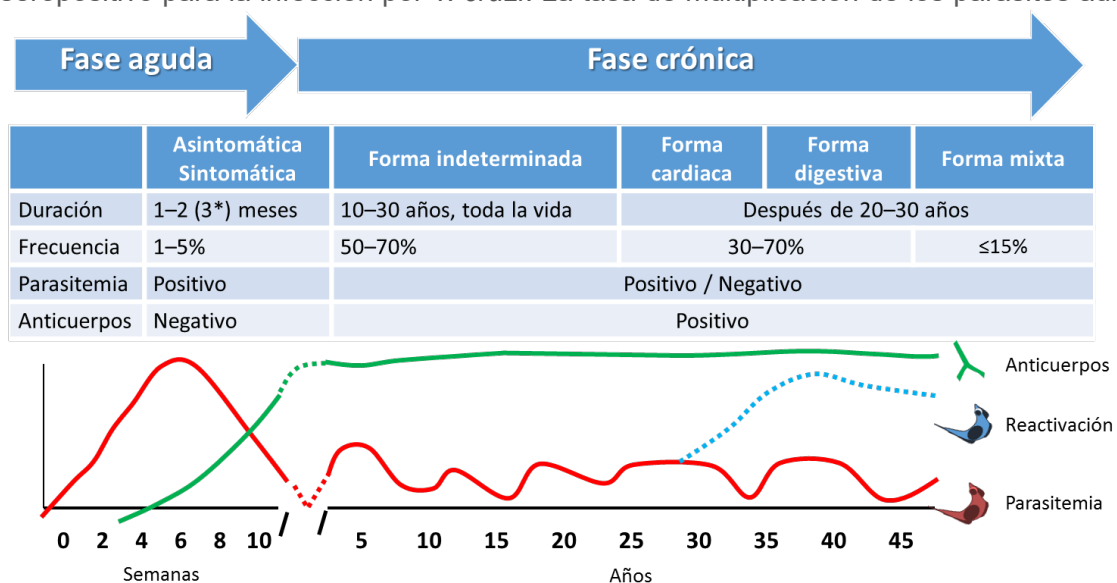


Figura 11. Características principales de las fases de la enfermedad de Chagas

3.3.2.4 Epidemiología

La enfermedad de Chagas es endémica principalmente en Latinoamérica, exceptuando el Caribe, pero los cambios demográficos han contribuido a su dispersión y en la actualidad ha aumentado su descripción en los países libres de transmisión vectorial. Las estimaciones de la OMS indican que de 5 a 7 millones de individuos estarían infectados por *T. cruzi*, de ellos entre 50.000 y 100.000 estarían residiendo en España. A nivel mundial causa alrededor de 10.000 muertes al año, y se producen alrededor de 9.000 casos nuevos por transmisión vertical.

En el siglo pasado su detección era predominantemente en el área rural. Como los cambios socio-económicos produjeron un éxodo del área rural, sumado a la deforestación y la urbanización, su detección aumentó tanto en áreas urbanas como periurbanas.

En áreas endémicas con transmisión vectorial en el intradomicilio, la infección se adquiere principalmente en los primeros años de vida (antes de los 5 años de edad). En áreas libres de transmisión en el domicilio, los infectados suelen tener mayor edad (adultos) y está relacionada con actividades como la agricultura, la pesca o la caza que favorecen la exposición a vectores selváticos.

En España, la enfermedad de Chagas es predominantemente importada, el 95% de los casos proceden de Bolivia y los casos autóctonos se han producido por transfusión de hemoderivados sanguíneos (6 casos), transmisión vertical (con una tasa media del 4%), trasplante de órganos y accidentes de laboratorio.

La detección en turistas es anecdótica, se ha descrito un caso tras un viaje a zonas donde la transmisión vectorial no está controlada (Amazonas). La detección en población europea está relacionada con estancias prolongadas en áreas de transmisión activa.

Aunque no se ha establecido una asociación entre el genotipo infectante y el perfil clínico de la enfermedad, se observa que TcI predomina por encima del ecuador, mientras que el resto de genotipos están representados en diferentes proporciones en el cono sur de Sudamérica. En Bolivia, las infecciones en niños se deben principalmente a infecciones por TcI y TcV, mientras que en adultos predomina TcV. En España, los estudios realizados muestran frecuencias similares a lo observado en el país de origen.

3.3.3 Diagnóstico de laboratorio

Debido a la complejidad del propio parásito y de su interacción con la respuesta inmune del individuo infectado durante la evolución de la infección, ninguna prueba parasitológica ni serológica por si sola se considera *gold standard*. En una infección aguda, la elección más adecuada es la detección del parásito. Cuando la infección evoluciona a la cronicidad (reciente o tardía), la determinación de anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* ofrecerá mayor información. No obstante, para realizar el seguimiento de un paciente, con o sin tratamiento, es necesario llevar a cabo y evaluar ambas determinaciones, detectar al parásito y determinar los niveles de anticuerpos.

3.3.3.1 Examen microscópico

La detección tradicional de *T. cruzi* se realiza mediante la observación directa de los tripomastigotes en una muestra de sangre ya sea en un examen en fresco, o en una extensión / gota gruesa teñida con Giemsa.

Para el diagnóstico microscópico es fundamental el uso de un microscopio óptico con posibilidad de alcanzar 100, 400 y 1000 aumentos. La muestra debe ser de reciente obtención y examinada lo antes posible tras su extracción (dentro de las 24 horas).

Para la **observación directa** en muestra fresca de sangre, se deposita una gota de sangre (aproximadamente 5 µl) entre un portaobjetos y un cubreobjetos y se realiza un barrido con un aumento de 100X (objetivo 10X y ocular 10X). Se observa detenidamente el movimiento de los glóbulos rojos y si se observa un movimiento

similar al de un torbellino, se cambia el objetivo para alcanzar 400X, con este aumento debe observarse la morfología y el tamaño del tripomastigote. Para dar un resultado NEGATIVO, la muestra debe ser examinada a 400X un mínimo de 50 campos (ver **Figura 12** y su vídeo y **Figura 13**).

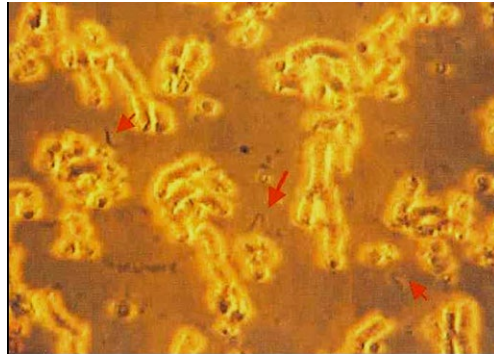


Figura 12. Tripomastigotes en un examen directo

Ver video en el link: <https://compartir.clinic.cat/storagecloud/index.php/s/ykzD3pXhLhxadtF> (clave 123)

La búsqueda de tripomastigotes en preparaciones teñidas se realiza a 400 aumentos (objetivo de 40X y ocular de 10X). Las características peculiares pueden observarse con aumento de 1000X (objetivo de 100X, ocular 10X y con aceite de inmersión).

La muestra más utilizada para el examen microscópico es la sangre, pero si se han realizado biopsias de tejido, tras su procesamiento mediante procedimientos de histología y tinción con Giemsa, es posible observar los nidos de amastigotes.

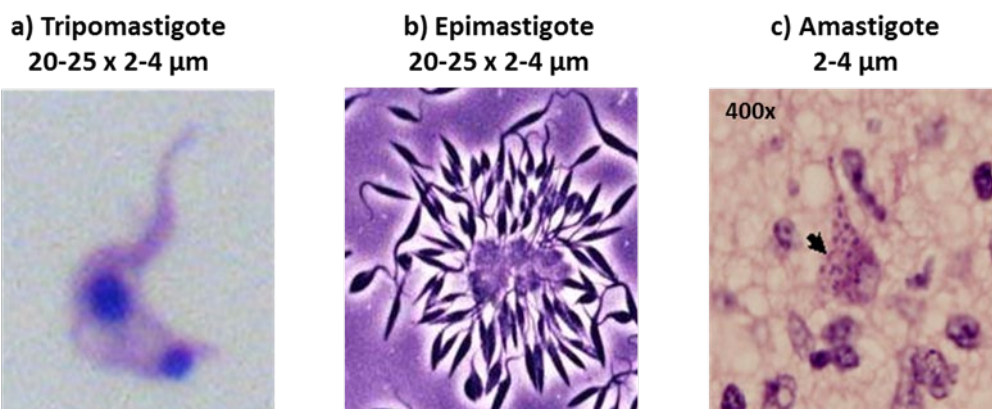


Figura 13. Principales formas evolutivas de *T. cruzi*: a) tripomastigote sanguíneo; b) epimastigotes en cultivo; c) amastigotes en tejido cerebral

Para la identificación morfológica y diferenciación con *T. rangeli* es necesario analizar las preparaciones teñidas con Giemsa (**Figura 14**). En estas extensiones, los tripomastigotes de *T. cruzi* se caracterizan por un kinetoplasto prominente, que da la sensación de estar pintado por encima del cuerpo del parásito. En cambio, en *T. rangeli* este organelo es más pequeño.

En algunas ocasiones la dificultad en la diferenciación morfológica de estas dos especies obliga a recurrir a técnicas moleculares. Este inconveniente se da principalmente en la fase aguda de la infección y en zonas co-endémicas de ambos parásitos, es decir en individuos que proceden del norte de Sudamérica y Centroamérica.

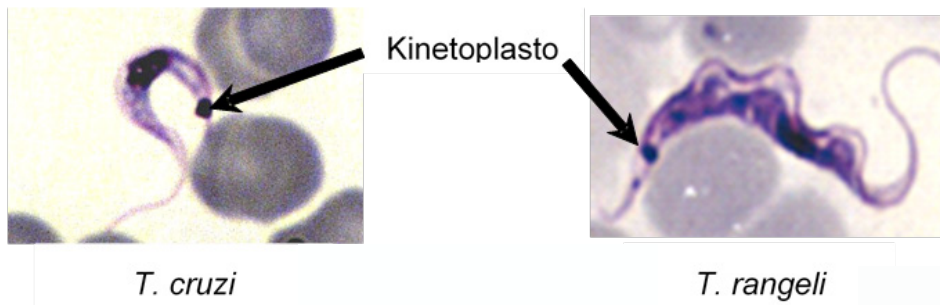


Figura 14. Características que permiten la diferenciación morfológica de los tripomastigotes de *T. cruzi* y *T. rangeli*

Cuando hay volumen suficiente de muestra se puede realizar la observación de los tripomastigotes después de llevar a cabo la prueba de Strout. Este procedimiento consiste en concentrar los parásitos a partir de 3 mL de sangre recogida sin anticoagulante, con incubación a 37°C durante una hora y tras varios ciclos de centrifugación, primero a 160xg para separar el coágulo del suero. El suero se deposita en otro tubo y se vuelve a centrifugar a 300xg, se recupera el sobrenadante en otro tubo y se centrifuga a 800xg. El sedimento se analiza como en la observación directa para detectar parásitos en movimiento.

Una variante de la **prueba de Strout** es la técnica del tubo capilar, que es de gran utilidad para el diagnóstico de infecciones congénitas, y para algunos países de áreas endémicas, es la técnica de referencia. También se la conoce como técnica del tubo capilar heparinizado o **microhematocrito**; esta prueba consiste en la identificación del movimiento característico de los parásitos en la interfase blanca entre el paquete de hematíes y el plasma. Se deben analizar entre 4 a 6 capilares. La muestra de sangre debe ser de reciente obtención y se puede utilizar cualquier tipo de anticoagulante. El capilar se rellena hasta el 80% de su capacidad, se sella con plastilina el extremo final del capilar, se centrifuga a máxima revolución durante 5 minutos en una centrifuga de capilares o a 800xg en una centrifuga de mesa común, dentro de un tubo normal sujetándolos con plastilina o algodón para evitar que los capilares se rompan. Para visualizar los parásitos se puede optar por una de las formas que se describen a continuación: i) romper el capilar por la interfase y depositar el contenido de esa zona entre portaobjetos y cubreobjetos como en la observación directa, o ii) el capilar se adhiere a la parte lateral del portaobjetos con una cinta adhesiva, se examina directamente la interfase y para visualizar diferentes profundidades, se gira el capilar. iii) Otra forma de visualización consiste en construir un soporte para dos capilares con un fondo oscuro, se cubre con una lámina y para eliminar la difracción de la luz se añade agua o aceite de inmersión (ver **Figura 15**).

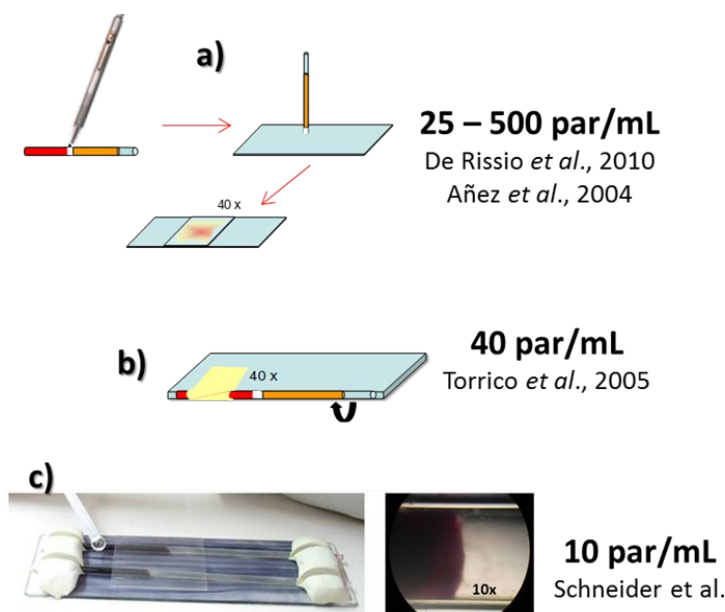


Figura 15. Variantes de visualización de la técnica de microhematocrito (a) adaptado a partir de Freilij et al. (1983); (b) adaptado de Torrico et al. (2005b) y (c) Schneider et al. (Comunicación personal)

La especificidad de las pruebas parasitológicas en general alcanza el 100%, sin embargo, se obtienen resultados falsos-positivos cuando las plaquetas adoptan formas que confunden a un observador poco experimentado. Su sensibilidad depende de la carga parasitaria y, fundamentalmente, de la habilidad visual del operador.

3.3.3.2 Pruebas de detección de antígeno

Los primeros ensayos de detección de antígenos de *T. cruzi* en orina y suero se describieron en 1987, se desarrollaron ensayos de captura en formato ELISA para el diagnóstico de la infección aguda y congénita e incluso de casos en fase crónica. Esta prueba se basaba en la utilización de anticuerpos anti-*T. cruzi*, monoclonales o policlonales, dirigidos contra glicoproteínas de membrana y citoplasmáticas. Los autores que describieron estos procedimientos no desarrollaron mayores avances. Sin embargo, en la pasada década, se publicó un ensayo denominado Chunap Test, esta prueba se basa en el uso de nanopartículas tratadas con anticuerpos anti-*T. cruzi* que permiten concentrar y detectar antígenos en orina de los pacientes con infección aguda, congénita o en fase de reactivación. Se demostró que los niveles de antigenuria estaban directamente relacionados con los niveles de parasitemia. De momento solo lo llevan a cabo los autores que han descrito la técnica y continúan estandarizándola. En una reciente publicación han optado por el formato de ELISA de captura y la producción de anticuerpos policlonales en alpaca y gallinas.

3.3.3.3 Técnicas serológicas

En la infección por *T. cruzi*, la producción de anticuerpos IgM es relativamente precoz, se genera a partir de la primera semana y generalmente se mantiene a lo largo de la fase aguda. De forma esporádica también puede observarse en la fase crónica. La utilidad de la detección de anticuerpos IgM es discutida, no se cuenta con una técnica apropiada para su determinación y por lo general se carece de controles adecuados. Además, a diferencia de lo que ocurre en otras infecciones, la presencia de IgM en los recién nacidos de madres infectadas con *T. cruzi*, no diferencia a un niño infectado de uno no infectado. Ya que durante el embarazo pueden pasar antígenos de *T. cruzi* al recién nacido, lo que hace que produzca IgM aunque no esté infectado. En el caso de recién nacidos no infectados, estas IgM desaparecen tras la ausencia de esos antígenos, por lo que la detección de IgM al nacer no tiene valor diagnóstico para diferenciar la infección en el bebé de la madre infectada. El papel de la detección de IgM en el diagnóstico precoz de la infección congénita sigue en estudio.

En este sentido, el diagnóstico serológico se basa principalmente en la determinación de anticuerpos IgG específicos anti-*T. cruzi*. Estos anticuerpos se generan a partir de la segunda semana después del ingreso del parásito y son los responsables de modular la parasitemia durante la fase aguda. A finales de la tercera a cuarta semana, los anticuerpos IgG específicos alcanzan niveles máximos que se mantienen elevados si el individuo infectado no recibe tratamiento etiológico.

A pesar de los avances tecnológicos, ningún ensayo serológico alcanza el 100% de sensibilidad y especificidad a la vez. Por ello, la confirmación de la sospecha clínica (diagnóstico de laboratorio de certeza) se sigue definiendo en base a la concordancia de, por lo menos, dos técnicas de distinto principio y antígenos diferentes. Para confirmar la infección en hijos de madres seropositivas, la detección de IgG solo se puede realizar después de los 9 meses de edad, tiempo en el cual, los anticuerpos maternos han caído y se puede detectar los anticuerpos propios del niño.

Afortunadamente, se han desarrollado numerosas técnicas que con el paso del tiempo y los cambios tecnológicos han evolucionado considerablemente en cuanto a sensibilidad analítica. Actualmente, según la naturaleza del antígeno, al conjunto de pruebas que emplean una mezcla compleja de antígenos crudos, purificados o totales, se denominan **técnicas serológicas convencionales**, estas pruebas comúnmente tienen el formato de HAI, IFI y ELISA.

Todas las pruebas cuyos antígenos son recombinantes o péptidos combinados, se conocen como **técnicas serológicas no convencionales**. Destacan entre ellas, las pruebas de ELISA, tiras inmunocromatográficas, aglutinación en tarjeta y sistemas automatizados basados en quimioluminiscencia o electroluminiscencia.

La **prueba HAI** consiste en la detección de anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* mediante la utilización de hematíes sensibilizados con antígenos obtenidos a partir de parásitos de cultivo, que se aglutinan en presencia de dichos anticuerpos. Aunque es un método reconocido por su especificidad, su sensibilidad es discutida. Algunos estudios han demostrado un número importante de falsos negativos, por lo que en los últimos años no se recomienda su uso como técnica de cribado de donantes de sangre. Se emplea fundamentalmente en países endémicos, en áreas de escasa infraestructura.

La **técnica IFI** se basa en el uso de epimastigotes de cultivo en fase estacionaria, fijados y conservados a -20°C . Mediante un anticuerpo secundario marcado con fluoresceína se evidencia la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi*, dirigidos principalmente contra los antígenos de superficie. En esta prueba se realizan diluciones seriadas del suero para determinar el título de positividad. La línea de corte, por lo general, es 1/40. En algunas zonas se considera positivo a partir de la dilución 1/20 y en otras sólo a partir de 1/80. Es de destacar que, en las reacciones cruzadas debido a enfermedades autoinmunes, la fluorescencia se observa solo en el núcleo del parásito, incluso a títulos elevados; en estos, el resultado para *T. cruzi* es negativo. En la actualidad, esta técnica se sigue realizando como la describió Camargo en 1966 con pequeñas modificaciones que dependen de la infraestructura de cada laboratorio. Ha demostrado ser muy robusta a pesar de la variabilidad inter-laboratorios. En España queda pendiente un ensayo de comparación para el establecimiento de la línea de corte (ver **Figura 16**).

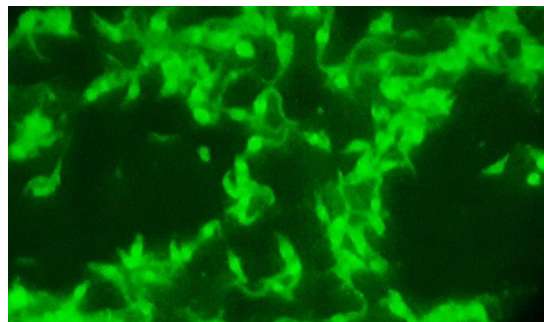


Figura 16. Inmunofluorescencia indirecta para la detección de IgG anti-*T. cruzi*. En las reacciones cruzadas debido a enfermedades autoinmunes, la fluorescencia se observa solo en el núcleo del parásito.

En la **prueba de ELISA** se utilizan mezclas complejas de antígenos, que pueden ser totales, semipurificados y/o recombinantes. En Brasil, por ejemplo, por la facilidad de su preparación se ha extendido el uso del extracto alcalino de epimastigotes, como el principal antígeno total para esta prueba. La línea de corte en estos ensayos se define mediante el promedio de las absorbancias (DO) observadas en muestras de suero de población sana al que se le suman 2 ó 3 desviaciones estándar. Alternativamente, se emplean curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*).

En el mercado español, actualmente, el único ELISA convencional comercial es el producido por Ortho Diagnostics. En el CNM está disponible un ELISA *in-house*.

Como la gran mayoría de empresas comerciales ha optado por una mezcla de antígenos recombinantes individuales o en formato de multi-epitope, es amplio el número de ELISAs no convencionales. La mayoría permite la detección de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi*, alguno permite la detección conjunta de IgG e IgM anti-*T. cruzi*, aunque no está claro el aporte de esta incorporación.

Como el cribado serológico en bancos de sangre es obligatorio o recomendado, prácticamente, en todo el mundo, algunas empresas han invertido en el desarrollo de sistemas totalmente automatizados. Se basan en la utilización de micropartículas magnéticas como soporte de los antígenos recombinantes y la quimioluminiscencia o electroluminiscencia como fundamento de la reacción. Estos sistemas tienen gran capacidad de procesamiento, permiten analizar un gran número de muestras en un tiempo corto. Los kits comerciales disponibles en España son: Alinity s Chagas de Abbott Diagnostics, LIAISON® XL MUREX Chagas de DiaSorin, BIO-FLASH Chagas de Biokit, Elecsys® Chagas de Roche. Para situaciones de baja carga de trabajo, Vircell

ha optado por el formato de monotest, CHAGAS VIRCLIA®. La sensibilidad diagnóstica de todas estas pruebas, entre ellas, es relativamente similar. Como la sensibilidad analítica está optimizada al máximo, la caída de anticuerpos maternos en un niño no infectado hijo de madre infectada puede tardar más que con las técnicas convencionales.

Los antígenos recombinantes se usan también en **tiras inmunocromatográficas**, en el pasado fue muy discutida su sensibilidad, pero según últimas publicaciones, en algunos escenarios como el de Estados Unidos, la prueba inmunocromatográfica Chagas Detect™ Plus Rapid Test, fue más sensible que las pruebas de ELISA convencionales y no convencionales que se disponen en ese país. Actualmente es una de las pruebas aprobadas por la FDA para su uso en diagnóstico. En Bolivia, en un estudio de campo se demostró que la combinación de dos pruebas rápidas, Chagas Stat-Pak y Chagas Detect™ Plus Rapid Test, permitía mantener una alta sensibilidad para realizar el diagnóstico de laboratorio en áreas rurales con escasos recursos. Asimismo, demostraron que las discordancias podían ser resueltas utilizando una tercera prueba rápida. En España se dispone de al menos dos formatos comerciales que son muy útiles como pruebas de confirmación. Se requieren nuevos estudios para re-evaluar su papel como herramientas de cribado.

3.3.3.3.1 Serodiscrepancias

Como el estándar de referencia es la combinación de dos pruebas, es común observar resultados discordantes entre el 1 y el 3%. En algunos casos, las reacciones falso-positivas se deben a otras patologías como la leishmaniasis mucocutánea y visceral, malaria, sífilis, toxoplasmosis, hepatitis, lupus eritematoso sistémico, esquistosomiasis, artritis reumatoide, paracoccidiomicosis, mononucleosis, o enfermedades autoinmunes. Si se hubiera descartado cualquier otra patología, como siguiente paso es conveniente repetir las mismas pruebas con una nueva muestra transcurridos 6 meses, y se podría observar una seroconversión positiva si la persona se hubiera expuesto recientemente (periodo de ventana). En estos casos, es fundamental el apoyo de la información epidemiológica del paciente.

La OMS recomienda la realización de una tercera prueba. Algunos investigadores postulan que la técnica de **Western blot** empleando antígenos de excreción-secreción (**TESA blot**) y la radioinmunoprecipitación de las glicoproteínas de 72 y 90 kDa (**RIPA**) podrían utilizarse como ensayos definitivos y de confirmación. Sin embargo, su empleo tampoco elimina la posibilidad de reacción cruzada con leishmaniasis, dado que los antígenos, si bien purificados, son equivalentes a los totales. Estudios realizados en Barcelona mostraron que el TESA blot tiene mayor concordancia con las pruebas cuyos antígenos son totales, es decir tiende en favor de la discrepancia causada por las pruebas convencionales. En la actualidad, TESA-blot se utiliza principalmente sólo en Brasil y con fines de investigación. En cuanto al RIPA, es la técnica de confirmación que se emplea en Estados Unidos, e igualmente presenta reacciones cruzadas con leishmaniasis.

Recientemente en Francia, se ha desarrollado una técnica de Western Blot empleando antígenos totales de *T. cruzi*, cuya sensibilidad y especificidad según los fabricantes es superior al 95%. La reacción cruzada con leishmaniasis y malaria se solventa mediante el análisis del perfil que se genera. Queda pendiente una evaluación profunda sobre este punto, aunque es posible que su utilidad sea mayor en el seguimiento post-tratamiento, ya que la interpretación de resultados se basa en el análisis de perfiles de reconocimiento.

Otra fuente de discrepancias es el contacto con *T. rangeli*, especialmente en zonas endémicas donde circula *T. cruzi* TcI. *T. rangeli* no es patógeno, pero puede estimular la generación de una respuesta inmune humoral y causar reacciones cruzadas.

Otra posible explicación de las discrepancias en zonas donde circula TcI, es la variabilidad de las cepas de este grupo. En el seguimiento de la evolución de la infección en modelo murino con dos cepas de *T. cruzi* I, se observaron dos comportamientos distintos de la respuesta inmune humoral. Mientras que con una de las cepas la respuesta inmune humoral era patente en la etapa crónica, con la otra se observaba una seroconversión de positivo a negativo.

Aunque es discutido, también se han descrito casos de eliminación espontánea del parásito, es decir, curación en pacientes que no recibieron ningún tratamiento específico. Investigadores argentinos, demostraron mediante estudios de inmunidad celular que los individuos con resultados serodiscrepantes tienen una capacidad de producción de IFN- γ elevada frente a antígenos de *T. cruzi*, respecto a los individuos sanos, apoyando la hipótesis de que esos individuos tuvieron contacto con *T. cruzi* y tuvieron la capacidad de eliminar el parásito. Otra fuente de discordancias entre los ensayos convencionales y no convencionales, es el efecto del tratamiento etiológico, no obstante, en estos casos su aparición se asocia a una posible curación de la infección. Se postula que la caída de anticuerpos tras el tratamiento se produce en un tiempo similar al tiempo de haber estado infectado. Las serodiscrepancias se suelen observar después de 5 años post-tratamiento y la IFI es la técnica donde se observa el impacto del efecto del tratamiento.

Estas discrepancias serán aún mayores si se combinan con los nuevos sistemas automatizados. La sensibilidad analítica de las nuevas pruebas es tan elevada, que incluso los anticuerpos maternos pueden detectarse más allá de los 9 meses de edad.

Para la adecuada selección de una determinada prueba serológica o la combinación de las mismas, es importante tener en cuenta el propósito de la tarea: i) cribado, ii) diagnóstico/confirmación o iii) seguimiento post-tratamiento. Para el cribado es suficiente el empleo de una prueba serológica, y se debe optar por una de elevada sensibilidad. Para el diagnóstico/confirmación, tras el cribado mediante una prueba de alta sensibilidad se debe emplear una prueba de alta especificidad. Para el seguimiento post-tratamiento se deberían combinar pruebas de alta especificidad, despreciando la sensibilidad. La caída de anticuerpos es más temprana en las pruebas convencionales HAI e IFI y en las pruebas no convencionales caseras que usan antígenos recombinantes simples. En las pruebas no convencionales multiplex, los niveles de anticuerpos frente a los diferentes antígenos deben ser analizados de forma independiente. La comparación de perfiles de reconocimiento mediante el Western Blot de antígenos totales también puede ser útil en el seguimiento post-tratamiento, y la desaparición de reactividad frente a algún conjunto proteico puede ser indicador de la caída de los niveles de anticuerpos. Sin embargo, el seguimiento post-tratamiento es un área de trabajo que aún queda por dilucidar, por ello sería recomendable un consenso para la creación de un biobanco.

3.3.3.4 Detección de ácidos nucleicos

La detección del ADN de *T. cruzi* se realiza principalmente en sangre, aunque su ausencia no descarta la posibilidad de que esté presente en tejidos. Se realiza principalmente mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se ha constituido en la alternativa más accesible cuando se carece de personal especialista en la identificación y diferenciación morfológica de *T. cruzi*, con respecto a otros tripanosomátidos que circulan en co-endemicidad. Aunque su ejecución requiere un tiempo mayor al empleado en una observación directa, es inferior al necesario para la detección de la presencia de parásitos mediante xenodiagnóstico (90 días) y hemocultivo (6 meses). En cuanto a su sensibilidad, analíticamente se podría detectar hasta el 0,1% del contenido genómico de *T. cruzi*. Sin embargo, en el diagnóstico de la infección crónica, la mayoría de los estudios reportan sólo una ligera diferencia con respecto al xenodiagnóstico y al hemocultivo. Esto se debe a que los individuos que cursan la fase crónica de la infección tienen una parasitemia baja, siendo en algunos casos incluso indetectable por cualquier metodología. Para solventar este inconveniente, se recomienda analizar 3 muestras independientes tomadas en días diferentes y realizar la PCR en triplicado. Este análisis ha permitido demostrar que algunos pacientes presentan parasitemias persistentes, otros tienen parasitemias intermitentes, y en algunos casos, la parasitemia siempre es indetectable. Por ello, el análisis seriado puede incrementar la probabilidad de detección del parásito del 40-60% de sensibilidad al 80-100%.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, la detección de ADN de *T. cruzi* mediante PCR es una herramienta diagnóstica en la fase aguda, infección congénita y la reactivación aguda. En la fase crónica, la PCR es una herramienta complementaria al diagnóstico serológico, y es muy útil para la monitorización del tratamiento como marcador de fallo terapéutico.

Desde la introducción de la PCR en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, se han descrito numerosas dianas moleculares que permiten la detección específica de *T. cruzi*. En diagnóstico, las dianas más utilizadas

son el minicirculo del kDNA y la secuencia repetida del ADN satélite. Un parásito tiene 10^4 minicírculos y $10^4 - 10^5$ copias de ADN satélite. Con el empleo de las dos dianas es posible conseguir la detección inequívoca del contenido genómico de 1 parásito, e incluso cantidades inferiores. Sin embargo, este límite de detección también depende, además del número de repeticiones de la diana de amplificación, de las condiciones de la reacción, la variabilidad de la parasitemia, el tipo y cantidad de muestra biológica (ver **Figura 17**).

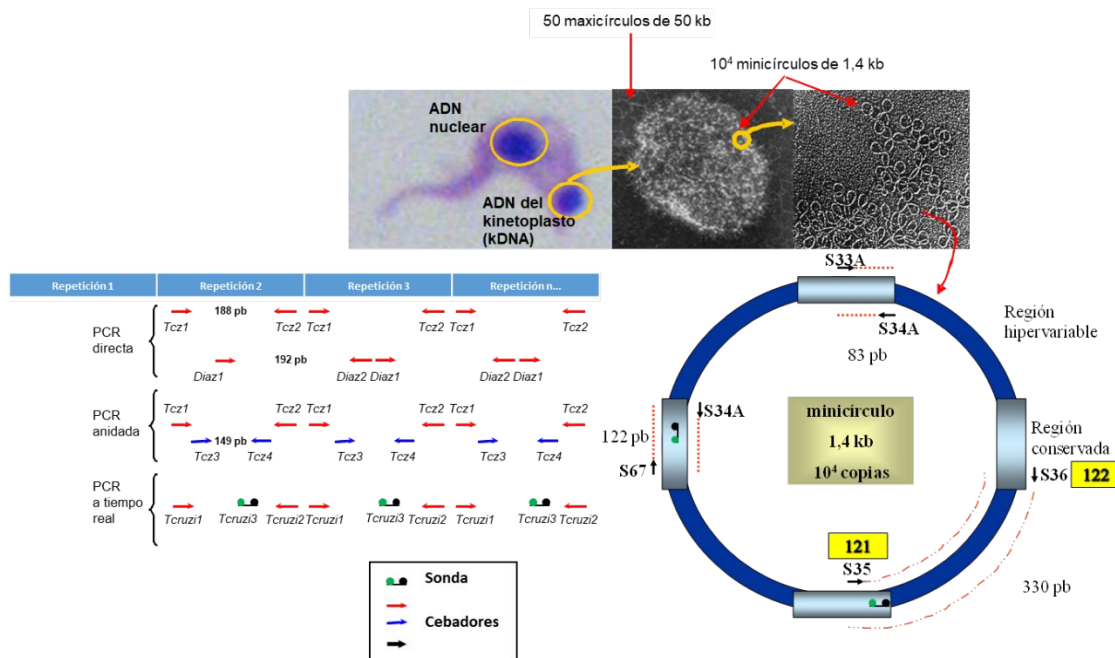


Figura 17. Dianas moleculares de utilidad para el diagnóstico de *T. cruzi* mediante PCR: ADN satélite y el minicirculo del kDNA (Modificado de: Flores-Chavez M, et al. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007;25 Supl 3:29-37; Sturm, et al. *Mol Biochem Parasitol.* 1989; 33:205-14; Barker DC. *Micron* 1980; 11:21-62. [cid:C75C923BF8C01D44AC7C9412BEA6B1EE@eurprd08.prod.outlook.com])

Así como en otras patologías, en los últimos años se ha introducido también la PCR a tiempo real como herramienta para la detección del ADN de *T. cruzi*. Mediante esta metodología se reduce el tiempo de visualización de los productos de amplificación, facilitando así la brevedad del análisis de los resultados. Si bien, su utilización en el diagnóstico de la infección crónica tiene las mismas limitaciones que una PCR convencional, ha permitido estimar las cargas parasitarias. En la infección aguda se ha observado que la parasitemia rondaba entre 5 y 55 000 parásitos/mL y, en la infección crónica, estaba por debajo de 10 parásitos/mL. Otro estudio mostró que los niveles de parasitemia disminuían con la edad. En España se observó que a mayor estancia fuera de área endémica, menor era la probabilidad de detección del ADN de *T. cruzi* en circulación sanguínea.

Las dianas moleculares de la PCR a tiempo real son las mismas que las de la PCR convencional. Según el estudio multicéntrico liderado por investigadores de Argentina, se ha observado que la sensibilidad analítica del kDNA es similar para todos los genotipos de *T. cruzi*. Mientras que la sensibilidad del ADN satélite es un logaritmo inferior para TcI y TcIV. En contrapartida, en zonas donde circula *T. rangeli* es mejor emplear el ADN satélite. En la PCR convencional, la PCR del kDNA diferencia ambos tripanosomátidos por el tamaño del producto amplificado, en la qPCR del kDNA, de momento, no es posible diseñar una sonda exclusiva de *T. cruzi*. En países como España, ambas dianas son igual de útiles, la probabilidad de que un individuo esté parasitado por *T. rangeli* es remota (factible en periodo de ventana).

Desde el punto de vista comercial, la mayoría de los kits de PCR se basan en la detección del ADN satélite. La primera PCR comercial (*T. cruzi* OligoC-TesT), se basaba en su amplificación en formato convencional y revelación mediante oligocromatografía. Como era una prueba rápida, presentaba una sensibilidad menor con respecto a las PCRs convencionales. En la actualidad los kits comerciales que se utilizan se basan en la misma diana, pero en formato de PCR a tiempo real, utilizando sondas Taqman, una de las sondas permite detectar a *T. cruzi* y la otra detecta el control interno de la reacción. Este control interno permite monitorizar si ocurren eventos de inhibición. Existen al menos 4 pruebas comerciales en Europa.

Con el propósito de aumentar la probabilidad de detección del ADN del parásito se recomienda procesar un mínimo de 5 mL de sangre cuando se trata de un adulto y de 2 mL cuando es un niño. En ambos casos la muestra debe pre-tratarse con el buffer guanidina 6M EDTA 0,2 M pH=8, volumen a volumen. El objetivo de esta mezcla es favorecer la distribución homogénea del material genómico de *T. cruzi*. Es aconsejable analizar entre 300 y 400 µL del lisado sangre-guanidina y eluir el ADN purificado en 100 y 200 µL, respectivamente.

Como la dificultad de la toma de muestra es mayor en un recién nacido / neonato, el volumen de muestra puede ser inferior a 1 mL. Generalmente en los casos de infección congénita, los niveles de parasitemia son elevados por lo que se pueden procesar pequeños volúmenes de muestra con éxito. Solo en estos casos, se puede analizar suero o plasma. Las muestras de los recién nacidos suelen presentar elevada cantidad de ADN, por lo que es conveniente asegurarse de que no ocurran problemas de inhibición. Como la muestra de sangre de cordón umbilical puede estar contaminada con sangre materna, un resultado positivo mediante PCR debe confirmarse analizando sangre periférica del niño.

Una limitante de la PCR convencional o a tiempo real es su propia sensibilidad analítica, por ello es importante la inclusión de controles tanto positivos como negativos en cada paso de manipulación, incluso desde la extracción, para realizar así una adecuada interpretación de resultados. Se han descrito resultados falsos positivos tras analizar muestras de sangre de cordón umbilical, que se explican por la contaminación de la misma con sangre materna en el momento de la toma de muestra. Otra fuente de resultados falsos positivos son las contaminaciones durante la extracción, este fenómeno se observa tanto en extracciones manuales como automatizadas, por ello es fundamental el empleo de controles.

Recientemente, también se ha descrito la amplificación isotérmica mediada por asas LAMP (*Loop-mediated Isothermal Amplification*) (**Figuras 18 y Figura 19**). Básicamente consiste en la amplificación del ADN satélite utilizando 4 iniciadores, que a temperatura constante de 65°C se alinean en 6 regiones distintas de la doble cadena del ADN durante 60 minutos. La reacción se realiza en un solo paso y produce turbidez por lo que una reacción positiva se puede apreciar a simple vista. Como también cuenta con un reactivo fluorescente, la reacción puede ser monitorizada a tiempo real, para ello se requiere que el proceso se realice en un equipo específico para ensayos de LAMP. La sensibilidad y la especificidad del LAMP dependen de los mismos factores que los descritos para la PCR.

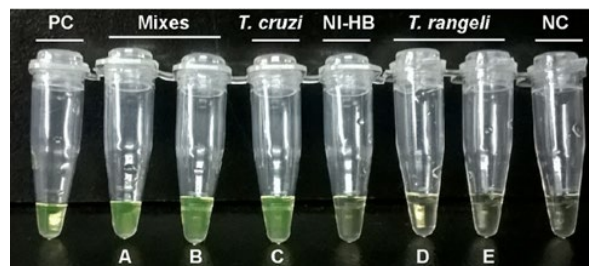


Figura 18. Prueba de LAMP. La reacción positiva se determina por la observación de turbidez de color verde (<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005779.g002>)

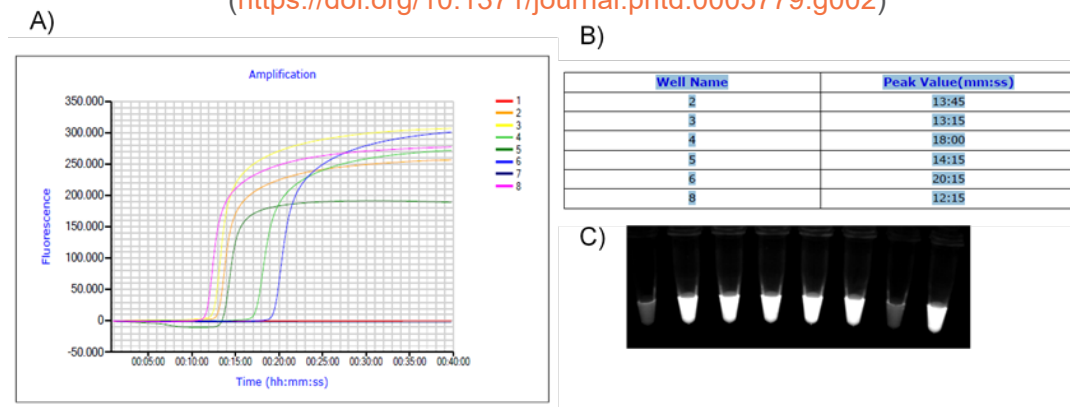


Figura 19. Prueba de LAMP realizada en el equipo Genie III: A) representación de las curvas de amplificación. B) Tiempo en el que las muestras dan una señal positiva y, C) observación de resultados a tiempo final.

Igualmente, la PCR, además de utilizarse en diagnóstico, se usa como herramienta de caracterización. Para este análisis, las dianas mejor estudiadas son el gen del minicélexon, los genes del ARN ribosomal (24S y 18S), los espaciadores intergénicos (ITS), el gen de la proteína de choque térmico 60 (HSP60), la secuencia repetida A10 y la región variable del minicírculo del kDNA. Ninguna por sí sola permite la clasificación taxonómica de *T. cruzi*, para ello se necesita el análisis combinado de al menos 3 dianas diferentes (https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-9148-8_17).

La caracterización del genotipo infectante en la infección crónica es muy limitada debido a la baja carga parasitaria, solo un tercio de los casos con diagnóstico positivo por PCR pueden ser detectados mediante las técnicas de caracterización convencionales. Es posible que un futuro la secuenciación masiva permita dilucidar el papel de la caracterización molecular de *T. cruzi*. En la **Figura 20** se presenta un algoritmo para el diagnóstico de laboratorio de la infección por *T. cruzi* y en la **Figura 21** un algoritmo para el diagnóstico de la infección congénita por *T. cruzi*.

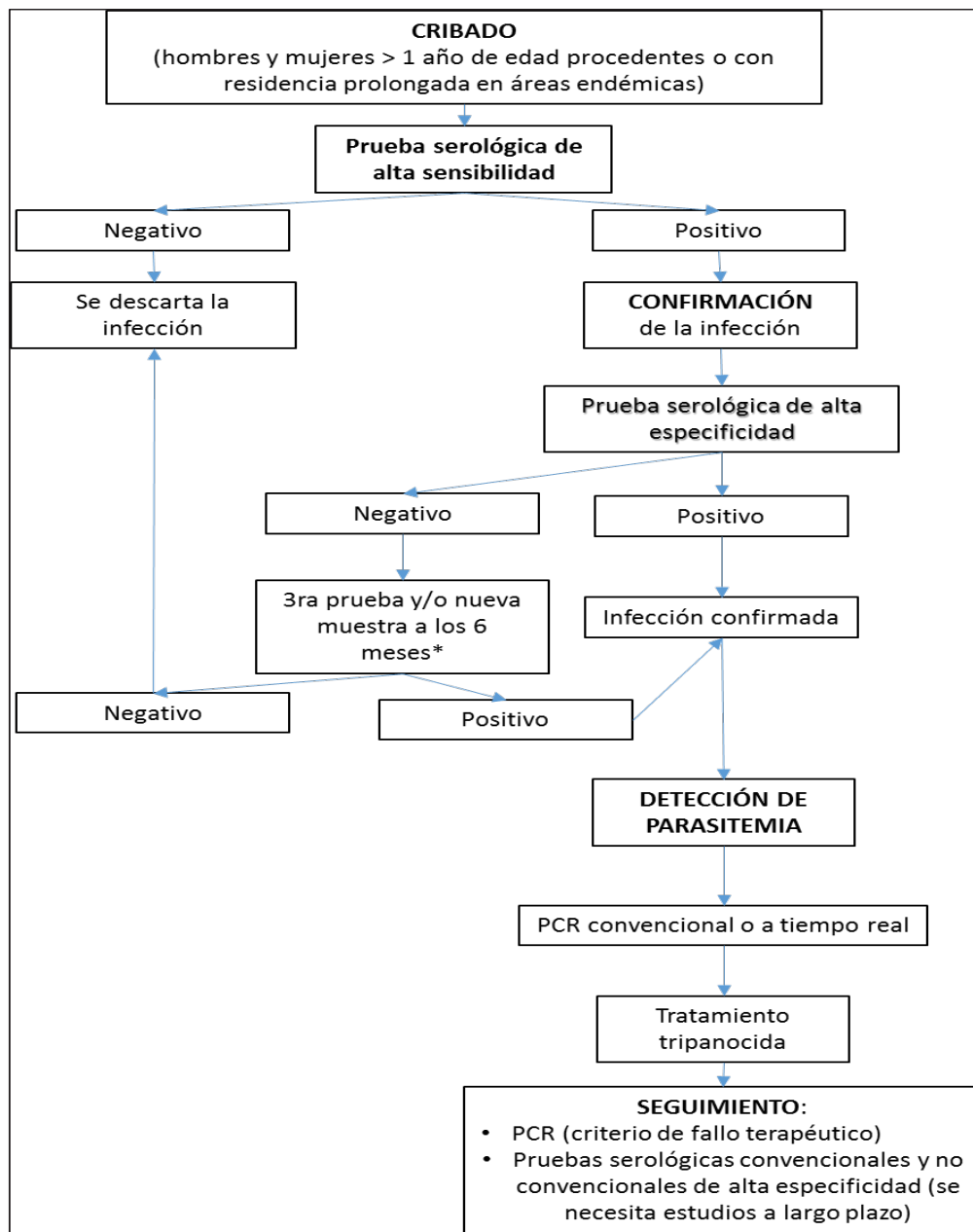


Figura 20. Algoritmo de mínimos del diagnóstico de laboratorio de la infección por *Trypanosoma cruzi*. *En caso de reciente exposición, se podría observar seroconversión positiva en la prueba de confirmación tras su repetición transcurridos los 6 meses

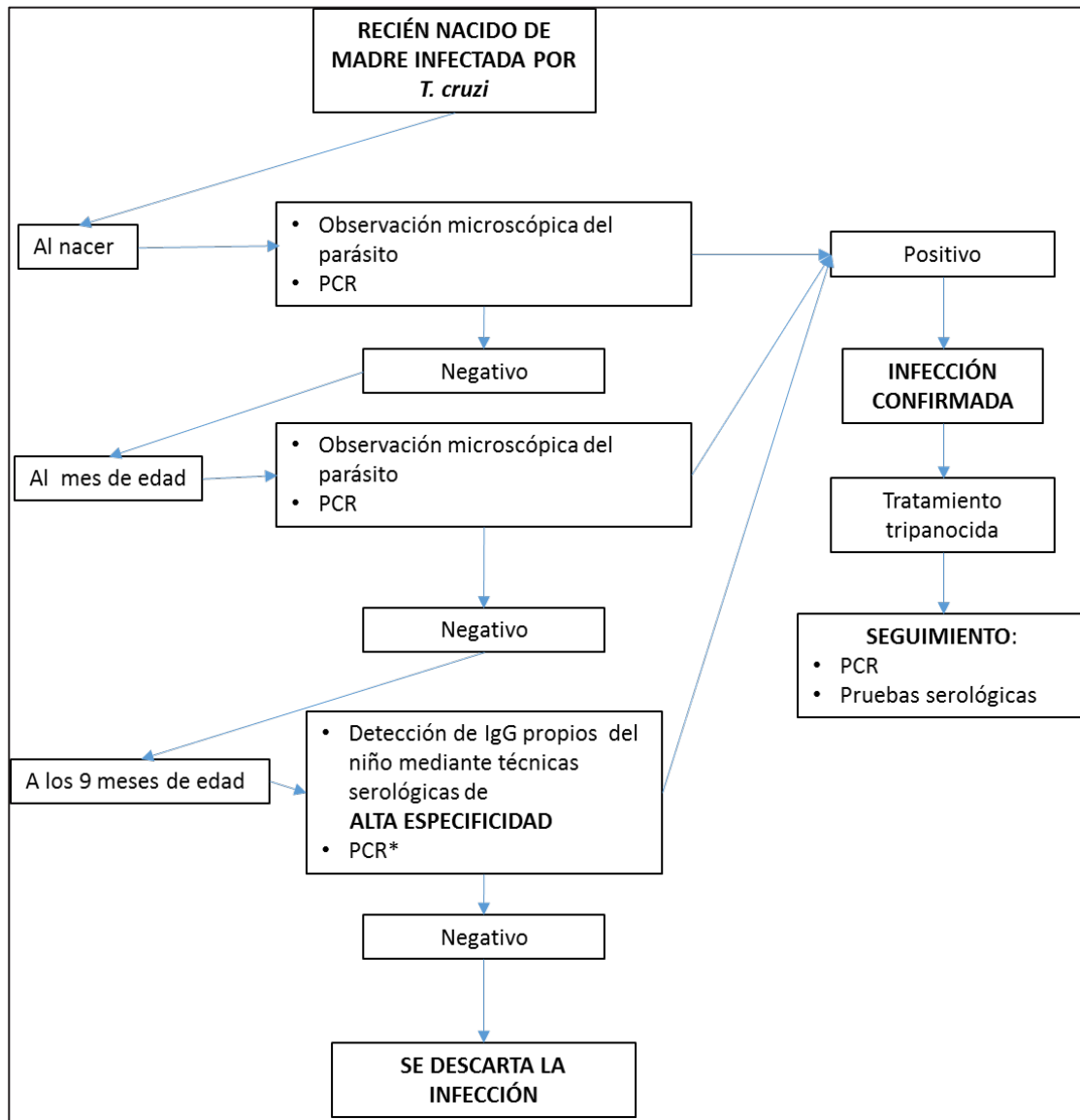


Figura 21. Algoritmo de mínimos para el diagnóstico de la infección congénita por *Trypanosoma cruzi*. *La PCR en una muestra obtenida a los 9 meses, sólo es necesaria si la serología presenta resultados positivos.

3.4 TRIPANOSOMIASIS HUMANA AFRICANA

3.4.1 Características generales

La tripanosomiasis humana africana (THA), también llamada enfermedad del sueño o encefalitis letárgica, es una enfermedad parasitaria sistémica, producida por protozoos del género *Trypanosoma*, transmitidos a los seres humanos por picaduras de las moscas tsé-tsé (género *Glossina*), que adquirieron la infección a partir de los seres humanos o animales que albergan los parásitos patógenos humanos.

Los agentes etiológicos de la tripanosomiasis humana africana (THA) son los protozoos *Trypanosoma brucei gambiense* y *T. b. rhodesiense*, dos subespecies de *T. brucei* morfológicamente indistinguibles. Taxonómicamente pertenecen a la clase *Kinetoplastea* y a la familia *Trypanosomatidae*. Son organismos unicelulares en forma de huso con único flagelo, miden aproximadamente entre 20 y 30 μm por 1,5 a 3,5 μm (Figura 22).

Tienen principalmente dos formas evolutivas, el tripomastigote y el epimastigote.

El tripomastigote es la única forma observada en los mamíferos, mientras que los epimastigotes son formas de desarrollo que se observan en la mosca tse-tsé.

Se multiplican por fisión binaria y son estrictamente extracelulares.

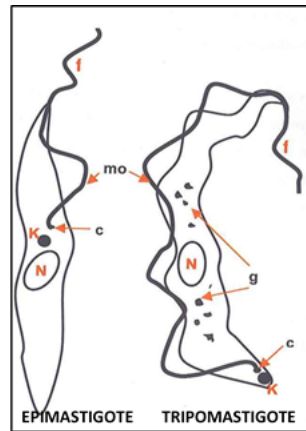


Figura 22. Principales formas evolutivas de *Trypanosoma brucei*. a.- axonema; c.- cinetosoma; g.- gránulos; k.- kinetoplasto; N.- núcleo; mo.- membrana ondulante; f.- flagelo

Es importante mencionar que el complejo *T. brucei*, incluye una tercera especie *T. b. brucei*, que causa la tripanosomiasis africana en animales, pero no es capaz de infectar a humanos.

3.4.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos

La evolución clínica depende del parásito involucrado y cursa en dos etapas, la primera denominada hemolinfática progresa a una segunda conocida como meningoencefalítica.

La THA por *T. b. rhodesiense* (THA rhodesiense) es típicamente aguda, progresa a la segunda etapa de la enfermedad en unas pocas semanas, causando la muerte en 6 meses. En cambio, la enfermedad por *T. b. gambiense* (THA gambiense) tiene un curso progresivo crónico, con una duración media estimada de 3 años, y con alta variabilidad interpersonal.

Comúnmente, en el sitio de la picadura de la mosca tsé-tsé, después de 2-3 días post-inoculación, en los infectados por *T. b. rhodesiense*, aparece una reacción dérmica de 3-4 cm conocida como chancro de inoculación. Esta reacción rara vez se ve en aquellos que contraen la enfermedad por *T. b. gambiense*.

En la primera etapa, en la **fase hemolinfática**, se presentan accesos de fiebre muy elevada durante varios días, separados por periodos afebriles, jaquecas, debilidad intensa, dolores de articulaciones, taquicardias, anemia, edema intenso, alteraciones circulatorias, pérdida de peso y picazón. Los primeros sistemas invadidos son el cardiovascular, renal y endocrino.

La segunda etapa, **fase neurológica o meningoencefalítica**, comienza cuando el parásito atraviesa la barrera hematoencefálica e invade el sistema nervioso central. Es en esta etapa donde se observan los característicos signos y síntomas de la enfermedad, cambia el comportamiento y el carácter del individuo, mostrándose indiferente, con menos concentración e irritable. A medida que avanza la infección, el humor es impredecible, pasando bruscamente de la alegría a la tristeza. Durante el día aparecen periodos de somnolencia cada vez más frecuentes y prolongados, por la noche aparece el insomnio y cualquier mínimo esfuerzo se hace imposible. Es típico el signo de la llave, o signo de Kerandel, que consiste en que el enfermo no puede abrir una cerradura por el dolor que le supone doblar la muñeca.

En la fase final el paciente entra en coma, proceso que le produce la muerte. Sin tratamiento, la THA se considera mortal, aunque los casos de portadores sanos apoyan la teoría de la existencia de «tripanotolerancia».

Epidemiológicamente, la THA es una enfermedad focal, su distribución es desigual, se limita a áreas circunscritas llamada "focos", más allá de la cuales no se produce la enfermedad. Actualmente, se han descrito alrededor de 360 focos de THA, todos los cuales están circunscritos en 36 países del África subsahariana y se encuentran principalmente en entornos rurales y remotos.

Alrededor de 300 focos son de THA gambiense, todos circunscritos en 24 países de África subsahariana (Angola, Benin, Burkina Faso, Camerún, Chad, República Centroafricana, Congo, Costa de Marfil, República Democrática del Congo, República del Congo, Guinea Ecuatorial, Gabón, Gambia, Ghana, Guinea, Guinea Bissau, Liberia, Malí, Níger, Nigeria, Senegal, Sierra Leona, Sudán del Sur, Togo, Uganda).

Los restantes 60 focos son lugares históricos de THA rhodesiense, es decir están circunscritos en 13 países africanos (Botswana, Burundi, Etiopía, Kenia, Malawi, Mozambique, Namibia, Ruanda, Swazilandia, Tanzania, Uganda, Zambia y Zimbabwe).

En los últimos 10 años, más del 70% de los casos registrados se han producido en la República Democrática del Congo (RDC). La RDC es el único país que ha declarado más de 1.000 casos nuevos al año y representa el 89% de los casos notificados en 2013.

Chad y Sudán del Sur declararon entre 100 y 200 casos nuevos en 2013. Se esperaban cifras similares en la República Centroafricana pero la inseguridad obstaculizó las actividades regulares de detección de casos. Países como Angola, Camerún, Congo, Costa de Marfil, Guinea Ecuatorial, Gabón, Ghana, Guinea Conakri, Kenia, Malawi, Nigeria, Uganda, República Unida de Tanzania, Zambia y Zimbabue están notificando menos de 100 casos nuevos por año.

Países como Benín, Botsuana, Burkina Faso, Burundi, Etiopía, Gambia, Guinea Bissau, Liberia, Mali, Mozambique, Namibia, Níger, Ruanda, Senegal, Sierra Leona, Suazilandia y Togo no han notificado casos nuevos durante más de una década. La transmisión de la enfermedad parece haberse detenido, pero todavía hay algunas áreas en las que es difícil evaluar la situación exacta porque las circunstancias de inestabilidad social dificultan la accesibilidad a distancia y las actividades de diagnóstico.

Botswana y Namibia están libres de transmisión de THA gracias al éxito de la campaña de eliminación de la mosca tsé-tsé. (<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005585.g003>).

En Europa los casos importados se han descrito principalmente en Francia, Reino Unido y Bélgica. En España, el número de casos importados es considerablemente reducido. En el CNM, en las últimas dos décadas, solo se han confirmado dos casos.

3.4.3 Diagnóstico de laboratorio

Como los signos y síntomas de la THA, en sus primeros estadios, son inespecíficos y fácilmente confundidos con otras patologías, la sintomatología de sospecha es insuficiente para definir un diagnóstico.

3.4.3.1 Examen microscópico

La visualización del parásito es la evidencia directa de la infección y por lo tanto permite el diagnóstico definitivo. Por ello, el método de referencia para el diagnóstico de la THA es la detección del parásito en sangre, aspirado de ganglios linfáticos o en la zona del chancro de inoculación bien por observación directa de los parásitos en movimiento en muestra fresca o teñidos con Giemsa u otros colorantes similares.

Es importante aclarar que la morfología microscópica no permite diferenciar ninguna de las tres subespecies del grupo brucei (*T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense* y *T. b. brucei*). Como *T. b. brucei* infecta exclusivamente a animales, se asume que los tripanosomas observados en una muestra clínica humana corresponden a *T. b. gambiense* o *T. b. rhodesiense*. La asunción de infección por una u otra especie se realiza teniendo en cuenta la región geográfica donde se ha producido la infección.

Como en otras infecciones, una limitación de la microscopía es su dependencia directa a la capacidad del observador y su experiencia, y muy especialmente a la parasitemia del paciente infectado, mucho menor en los casos de la THA producida por *T. b. gambiense* (THA gambiense).

Parasitemias superiores a 10.000 parásitos/mL se visualizan sin inconvenientes. No se observa el mismo éxito en parasitemias inferiores a 100 tripanosomas/mL. Por ello, la ausencia de parásitos no necesariamente descarta la infección. Para solventar este inconveniente se recomienda realizar un análisis seriado en días consecutivos, aumentar el volumen de partida y realizar técnicas de concentración. Un factor importante es el tiempo que transcurre desde que se toma la muestra hasta que se analiza. La observación microscópica de los tripanosomas debe realizarse lo antes posible, para evitar la pérdida de sensibilidad por la inmovilización de los parásitos y/o su subsecuente lisis. Los tripanosomas son sensibles a la luz del sol y se mantienen mejor cuando se conservan en frío y al abrigo de la luz.

Al igual que en la tripanosomiasis americana, para visualizar los tripanosomas en movimiento, se depositan entre portaobjetos y cubreobjetos, 5 y 10 μL de sangre obtenida por punción del dedo y se analizan a 400x. El movimiento de los tripomastigotes es muy característico, su límite de detección es 10.000 parásitos/mL. Una preparación fina teñida con Giemsa no mejora la sensibilidad, el límite de detección sigue siendo muy similar a la observación directa en fresco. Sin embargo, una gota gruesa teñida puede permitir visualizar parasitemias superiores a 5.000 tripomastigotes. Es la técnica de elección en condiciones de infraestructura limitada, aunque es tediosa, se requieren al menos 10 a 20 minutos de observación por preparación.

Los tripanosomas también se pueden detectar en los aspirados de los chancros de inoculación, incluso antes de que se encuentren circulando en la sangre. El aspirado de los ganglios linfáticos cervicales o de los chancros se examina de igual forma que una muestra de sangre, realizándose una visualización directa o una preparación fina o gruesa teñida con Giemsa (ver **Figura 23** y vídeo, y **Figura 24**).

Dada las características de la enfermedad, el parásito se detecta sólo en el 70 a 80% de los casos, especialmente en la THA gambiense.

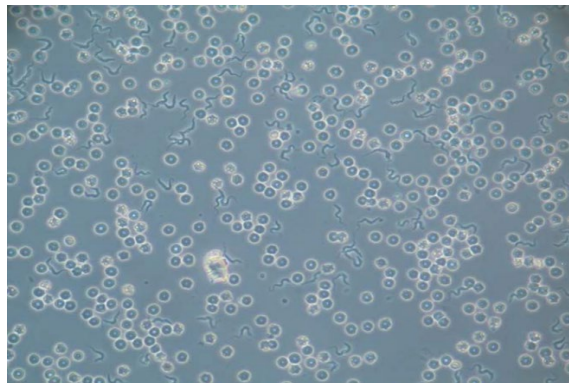


Figura 23. Preparación de *Trypanosoma brucei* in vivo. (Foto: J. M. Rubio; ver los parásitos en movimiento en el siguiente link: <https://compartir.clinic.cat/storagecloud/index.php/s/9oCk5KG4D0Fu5IA>; clave 123)

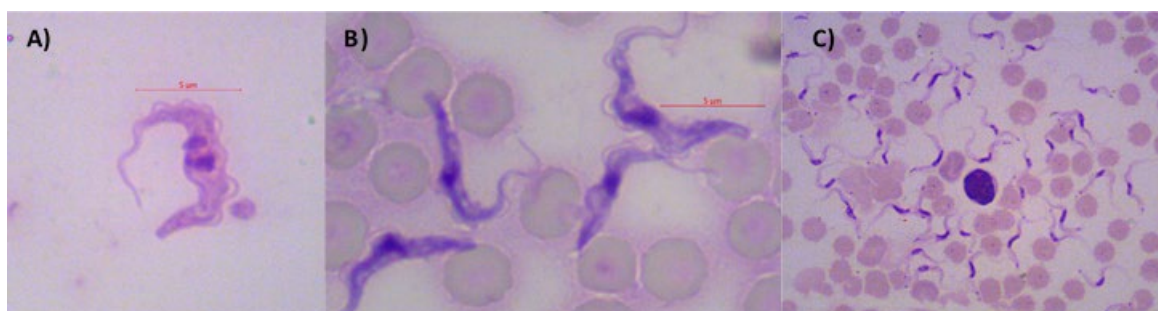


Figura 24. Preparaciones teñidas: gota gruesa (A), extensiones finas (B y C) a 1000x

Al igual que en la enfermedad de Chagas se puede utilizar la **técnica del tubo capilar**. Dependiendo del número de capilares que se analicen, la sensibilidad se incrementa, detectándose parasitemias de al menos 500 tripomastigotes/mL.

Otra alternativa para la detección parásitos es la concentración en **mini columnas de intercambio aniónico** (mAECT). Esta técnica consiste en separar los tripanosomas a partir de sangre venosa mediante cromatografía de intercambio aniónico, ya que estos tienen una carga negativa menor que las células sanguíneas. Posteriormente, los parásitos se concentran mediante centrifugación a velocidad baja en un tubo colector de vidrio sellado. A continuación, la punta del tubo se examina bajo el microscopio, depositándolo en un contenedor especial. El gran volumen de partida (350 μ L de sangre) facilita que se alcance la visualización de parasitemias equivalentes a 50-100 parásitos /mL (ver **Figura 25**).

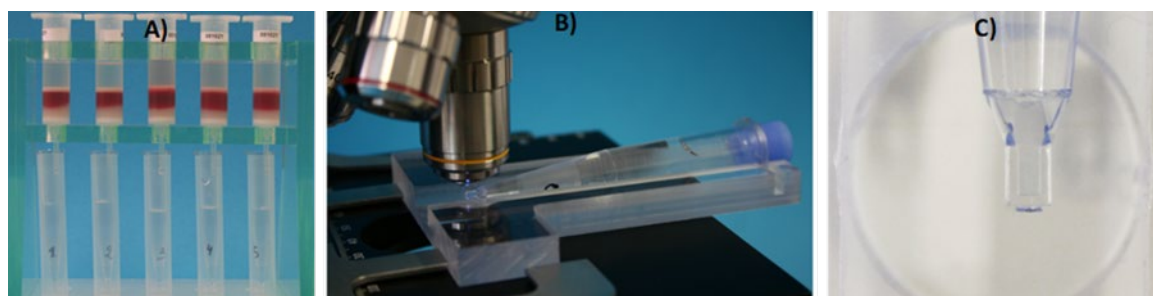


Figura 25. Columnas de intercambio aniónico (A), dispositivo para montar los tubos colectores de tripanosomas (B) y, detalle de la punta del tubo colector (C).

Büscher et al 2009. <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000471>

3.4.3.2 Técnicas de detección de antígeno.

Desafortunadamente no ha habido mejoría en el desarrollo de las pruebas de detección de antígenos para esta parasitosis. Un primer intento se realizó mediante un ELISA de captura, posteriormente se estandarizó un test de aglutinación indirecta en tarjeta (TrypTect CIATT), que presentó elevada sensibilidad comparada con otras pruebas parasitológicas, pero subsecuentes estudios pusieron en duda su especificidad.

3.4.3.3 Técnicas serológicas

Una evidencia indirecta de la infección por *T. b. gambiense* es la detección de anticuerpos específicos frente a los tripanosomas en sangre, plasma o suero del individuo infectado.

Es importante mencionar, que los tripanosomas tienen una estructura antigénica compleja que provoca la producción de un gran espectro de anticuerpos. Los anticuerpos de tipo IgM e IgG específicas anti-*T. b. gambiense* están presentes en concentraciones elevadas y reaccionan frente a las glicoproteínas de superficie, antígenos inmunodominantes del parásito. Por ello, el tipo de antígeno es un factor limitante de la sensibilidad y especificidad de las pruebas de detección de anticuerpos.

Los anticuerpos específicos se pueden detectar entre 3 y 4 semanas posteriores a la adquisición de la infección, persistiendo incluso hasta 3 años después post-tratamiento. Por ello, la interpretación de un resultado de serología positiva debe realizarse con precaución.

Los métodos serológicos actuales no tienen utilidad para el diagnóstico la THA rhodesiense, en primer lugar porque *T. b. rhodesiense* presenta una alta variabilidad de antígenos de membrana que no ha permitido el desarrollo de un sistema de detección universal y, en segundo lugar, más importante, el tiempo necesario para que se generen los anticuerpos frente a un determinado antígeno y que su reactividad sea detectada (más de cuatro semanas) es superior a la presentación de los síntomas de la segunda etapa.

La técnica serológica más utilizada es el **CATT/ *T. b. gambiense***. Se trata de un método de aglutinación rápido y simple para la detección de anticuerpos específicos anti-*T. b. gambiense* en la sangre, plasma o suero de pacientes con THA gambiense. El antígeno consiste en un liofilizado de las formas sanguíneas de *T. b. gambiense*, antígeno variable tipo LiTat 1.3. La producción de antígeno es un proceso lento, basado en la extracción de tripanosomas de sangre de ratas infectadas. Los tripanosomas se fijan, se tiñen con azul de Coomassie y se liofilizan. El reactivo se produce solo en el Instituto de Medicina Tropical en Amberes, Bélgica. Aunque no está registrado por ninguna agencia reguladora, la introducción de CATT / *T. b. gambiense* como sistema de cribado universal ha supuesto un importante avance en la vigilancia activa de la población infectada por *T. b. gambiense* limitándose los exámenes parasitológicos solo a los pacientes seropositivos por CATT.

La sensibilidad del CATT en sangre completa sin diluir (CATT-WB) varía entre 87 y 98%, pero su valor predictivo negativo es excelente durante el cribado masivo. No obstante, pueden producirse resultados falsos-negativos, en especial en pacientes infectados con cepas de tripanosomas que carecen o no expresan el gen LiTat 1.3. También se pueden obtener resultados falsamente negativos por el efecto pro-zona, fenómeno que ocurre cuando se analiza sangre o suero sin diluir.

Como el CATT tiene sus limitaciones, se han desarrollado diferentes pruebas alternativas o complementarias a ella, de momento sin mucho éxito. Algunas de ellas sólo están disponibles en centros especializados. Entre ellas podemos citar:

- i) el ensayo de látex que combina 3 antígenos de superficie, LiTat 1.3, 1.5, y 1.6 con las partículas de látex, cuyo procedimiento es similar al del CATT;
- ii) la prueba de inmunofluorescencia indirecta frente al parásito total;
- iii) un ensayo de ELISA basado en los mismos antígenos descritos en el ensayo de latex y, recientemente,
- iv) una prueba rápida comercializada (SD BIOLINE HAT) que consiste en una prueba inmunocromatográfica para la detección cualitativa de anticuerpos de todos los isotipos (IgG, IgA e IgM) frente a las dos glicoproteínas variables de superficie: VSG LiTat1.3 y VSG LiTat 1.5 de *T. b. gambiense*. La prueba consiste en depositar 20 µl de sangre completa y 4 gotas de un buffer de dilución. La lectura de los resultados se realiza en 20 minutos (ver **Figura 26**).

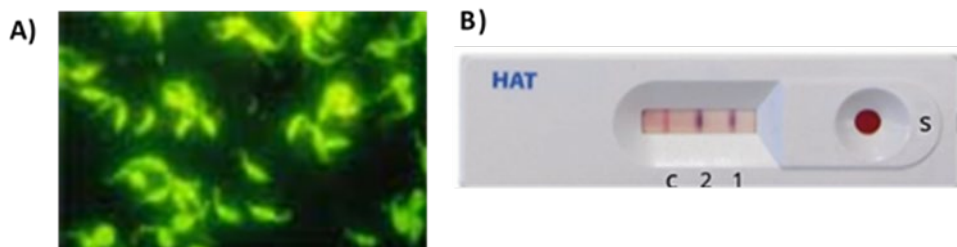


Figura 26. Inmunofluorescencia indirecta (A) y prueba rápida SD Bioline HAT (B). Bisser et al. 2016. <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004608>

En el CNM están disponibles las técnicas del CATT e IFI.

3.4.3.4 Detección de ácidos nucleicos

Las dianas utilizadas por los diferentes métodos son muy variadas, e incluyen desde ADN satélite del parásito, ITS, 18S rDNA, kDNA, al gen SRA (*serum resistance associated gen*) de *T. b. rhodesiense*, con límites de detección que van desde 0,001 parásito de un método LAMP que amplifica un ADN repetitivo (RIME: *repetitive insertion mobile element*) hasta PCRs simples con límites de detección de 100 parásitos, aunque la media está entre 0,1 y 1 parásito.

Mugasa *et al.* (2012), tras evaluar 16 artículos con diferentes técnicas diagnósticas PCR (n = 12), NASBA (n = 2), LAMP (n = 1) y un estudio comparativo de PCR y NASBA (n = 1), concluyeron que la PCR es un método lo suficientemente preciso como para sustituir a la microscopía que actualmente es el método diagnóstico de referencia, en especial en la primera etapa de la enfermedad. Aunque también pone en evidencia que se requieren otros estudios con mejores diseños para conocer el verdadero valor de la PCR en el diagnóstico de la THA. Otro estudio que comparó los métodos parasitológicos y moleculares con respecto al CATT, confirmó, que efectivamente, mediante la aplicación de la PCR se detectó un mayor número de casos que aplicando la técnica del microhematocrito (89,5% vs. 47,5%, respectivamente).

La diferenciación molecular entre *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense* se basa principalmente en dos genes. El gen de la glicoproteína (TgsGP) que sólo está presente en *T. b. gambiense* y el gen que codifica la proteína asociada a la resistencia al suero (SRA) que sólo está presente en *T. b. rhodesiense*.

En el Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, se utiliza la PCR a tiempo real basada en el gen del ARN ribosomal de la subunidad pequeña del ribosoma. Esta técnica amplifica los 3 principales tripanosomátidos patógenos, *Leishmania* spp., *T. cruzi* y *T. brucei*, emplea a la vez una sonda *Taqman* específica para *T. brucei* y Eva Green como agente intercalante para realizar el análisis de *T melting*. Con la primera aproximación detecta específicamente *T. brucei*, y con la segunda aproximación diferencia los 3 grupos de patógenos, confirmando el resultado obtenido mediante la sonda. Solo en caso de obtenerse un resultado positivo se realiza la diferenciación de especies (**Figura 27**). En la **Figura 28** se presentan los algoritmos de diagnóstico de la THA, adaptados a las técnicas disponibles en España.

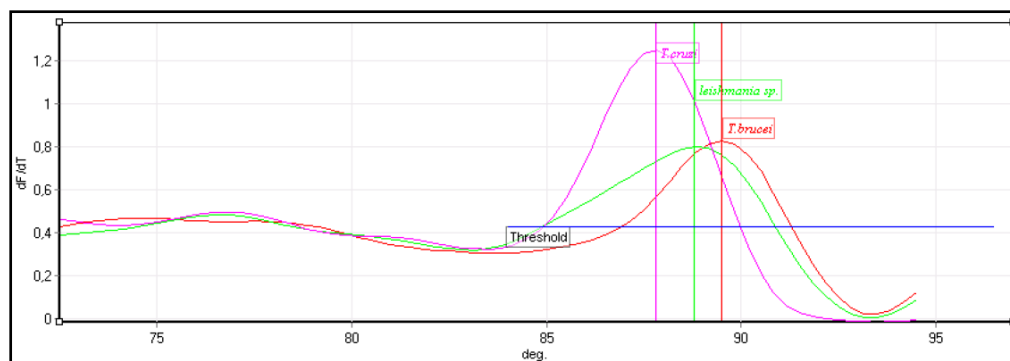


Figura 27. Análisis de T melting para la diferenciación de *T. brucei* de *T. cruzi* y *Leishmania* spp. (Tomado de: Tammam, M. 2009)

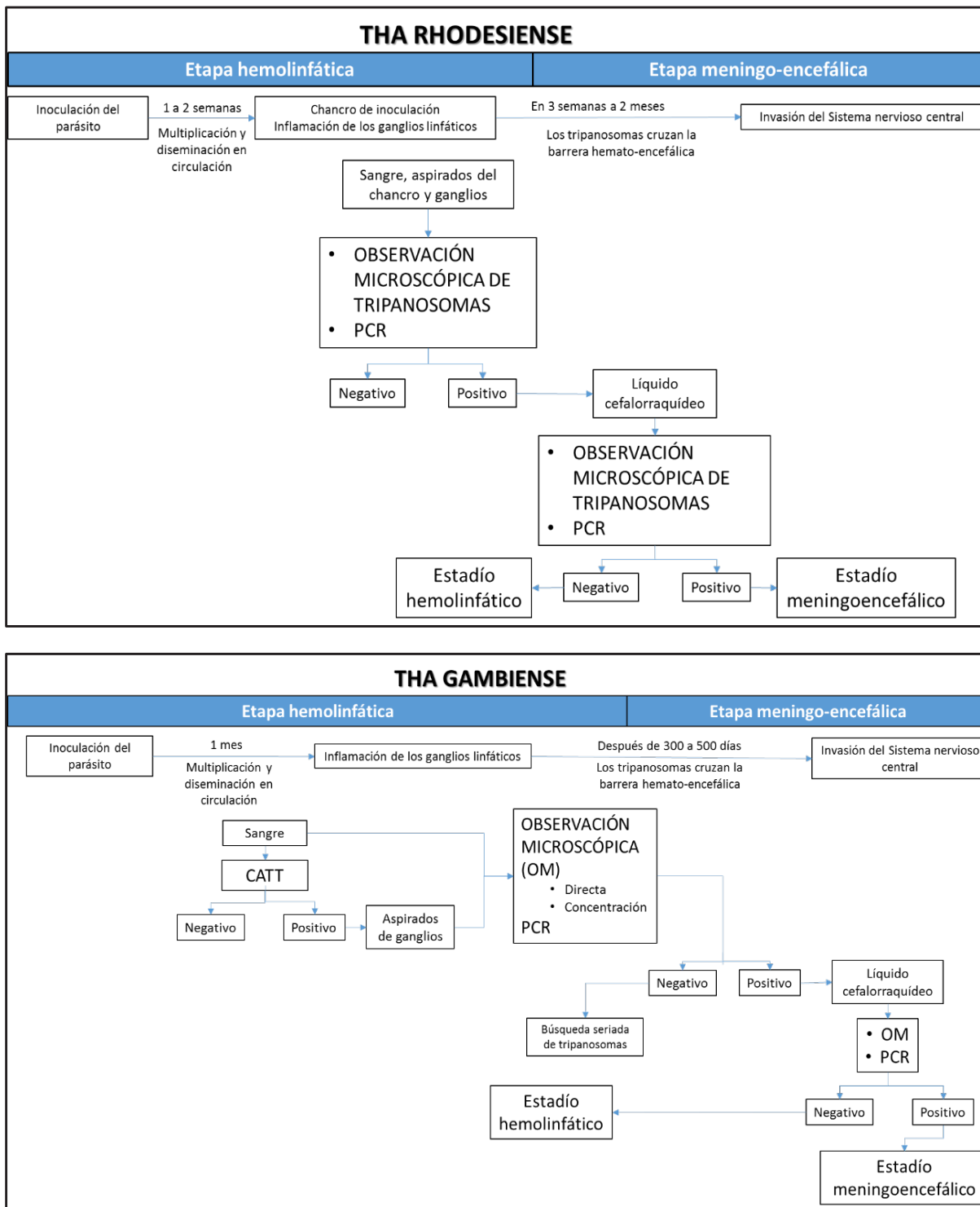


Figura 28. Algoritmos de diagnóstico de la THA, adaptado a las técnicas disponibles en España. Si se sospecha que el paciente afectado está en la etapa meningo-encefálica, y se ha decidido realizar la obtención de LCR, es conveniente analizar también una muestra de sangre en paralelo.

4.1.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos

Los cuadros clínicos varían desde la microfilaremia asintomática; la sintomatología aguda con fiebre, linfadenitis y linfangitis, orquitis y epididimitis, que llevan un curso recidivante y se acompañan de eosinofilia; y los síntomas crónicos secundarios a la obstrucción de la circulación linfática con linfedema de extremidades, hidrocele y quiluria que puede evolucionar hasta la elefantiasis grave con discapacidad permanente, que afecta hasta al 1% de los infestados. Aunque todas las especies que producen filiarisis linfática cursan de manera similar, las manifestaciones producidas por las especies de *Brugia* spp. suelen ser más leves, sin afectación escrotal y están limitadas a miembros inferiores.

La eosinofilia pulmonar tropical es otra posible manifestación de las filiarisis linfáticas que aparece en el 0,5% de los pacientes, principalmente en varones jóvenes. Está causada por una reacción inmunológica desencadenada por las microfilarias presentes en los pulmones y cursa con tos no productiva, eosinofilia, febrícula y patrón intersticial en la radiografía de tórax. Característicamente no se encuentran microfilarias en sangre y los anticuerpos antifilaria están presentes a títulos altos.

4.1.3 Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico se basa, tradicionalmente, en buscar las microfilarias mediante técnicas de concentración en sangre periférica extraída a medianoche (entre las 22.00 h y las 02.00 h). La sensibilidad de las técnicas microscópicas depende del volumen de sangre extraído, del momento de la extracción y de la experiencia del observador, por lo que se han buscado otras técnicas con el fin de detectar antígenos de las filarias, anticuerpos o material genético. Ya se han comercializado técnicas sensibles de detección de antígenos circulantes de *W. bancrofti* por ELISA o inmunocromatografía en tarjeta que permiten el diagnóstico a partir de muestras de sangre obtenidas en cualquier momento del día.

4.1.3.1 Examen microscópico

La cantidad de microfilarias es mayor en sangre capilar que venosa ya que las microfilarias se concentran en los capilares periféricos. Es importante que la extracción de la muestra se realice alrededor de la media noche que es cuando los adultos liberan más microfilarias al torrente sanguíneo. La realización de técnicas de concentración aumenta la sensibilidad, ver PNT-PI-05 de este procedimiento: Examen de filarias en sangre mediante la técnica de concentración de Knott). Aun así, la sensibilidad de la microscopía es baja. Al observar el sedimento de la sangre concentrada, si se observan microfilarias, se tiñen con Giemsa o con hematoxilina-eosina para ver las características diferenciales con otras filarias (ver **Tabla 3**).

4.1.3.2 Técnicas serológicas

Existen diferentes ELISAs que detectan anticuerpos frente a diferentes antígenos recombinantes de la larva de tercer estadio (L3), como el antígeno Bm14 de *B. malayi* (Filiarisis CELISA test) o el WbL1, obteniendo este último una sensibilidad del 85% y una especificidad del 94%. Otros antígenos usados son BmSXP-1, BmR1, WbSXP-1 o Bm33. En general todos tienen una buena sensibilidad tanto para *W. bancrofti* como para las diferentes especies de *Brugia*, pero presentan menor especificidad al observarse reacciones cruzadas con otras filarias como *Onchocerca* spp., *Loa loa* o *Mansonella* spp. Estos anticuerpos se suelen desarrollar meses antes de que haya microfilarias en sangre periférica, lo que supone una ventaja frente a los tests de detección de antígeno, que tardan unos 18 meses en ser positivos.

La detección de IgG4 se ha visto que es más específica de infección activa, por lo que se han desarrollado tests de detección rápida de IgG4 frente a la proteína recombinante BmSXP de *W. bancrofti* (BLF Rapid™). PanLF Rapid (Reszon Diagnostics International Sdn. Bhd., Selangor, Malaysia) contiene además de la proteína BmSXP, la BmR1 para la detección de *Brugia* spp., pensado para zonas donde haya coendemia. También se han desarrollado tests rápidos en formato de LIPS (siglas del inglés, sistema de inmunoprecipitación de luciferasa) para la detección de IgG/IgG4 frente a otros antígenos como el Wb123 de *W. bancrofti* con mejores resultados de especificidad (98-100%).

Al igual que ocurre en el resto de técnicas serológicas para otras filarias, no distinguen entre infección activa o pasada, por lo que para población de área endémica da poca información, siendo fundamentalmente útiles en pacientes expatriados o viajeros, donde pueden detectarse estos anticuerpos, aunque no presenten microfilarias en sangre periférica, y para estudios de prevalencia. Tampoco son útiles como control de tratamiento puesto que disminuyen muy lentamente después del mismo y no diferencian entre las distintas filarias linfáticas.

4.1.3.3 Técnicas de detección de antígeno

Las técnicas de detección de antígeno son más usadas por su facilidad de uso y mayor sensibilidad frente a la detección microscópica para *W. bancrofti*. Detectan un antígeno circulante de la filaria adulta de 200 kDa, cuyos niveles son estables las 24 horas, por lo que puede usarse a cualquier hora del día. Como el antígeno es liberado por el adulto, no es necesario que haya microfilarias en sangre periférica, por lo que detecta tanto pacientes microfilarémicos como amicrofilarémicos. Este antígeno no se empieza a detectar hasta que no se desarrolla la filaria adulta, lo que puede tardar en ocurrir hasta 18 meses después de la infección y no es útil como control post-tratamiento, ya que puede detectarse antígeno residual hasta 3 años después.

Existen dos tipos de tests comercializados, los que detectan el antígeno a través de un test inmunocromatográfico rápido, y los ELISAs.

Los tests rápidos de detección de antígeno han sido usados durante años para detectar infección activa: el primero en comercializarse fue BinaxNOW® Filariasis card test (Alere, Inc., Scarborough, ME) en el año 2000, y el Filariasis Test Strip, que fue una mejora del anterior, comercializado en el año 2013 también por Alere y usado desde entonces. Son tests fáciles de usar, no requieren equipos complejos ni mucha formación y son muy específicos para infección activa, por lo que son recomendados por la OMS para usar en países endémicos. Los ELISAs detectan el antígeno circulante de filaria a través del anticuerpo monoclonal Og4C3 (TropBio Og4C3 ELISA test, Cellabs Pty Ltd, Queensland, Australia) o AD12-ELISA. Son cuantitativos y tienen un alto rendimiento, pero tienen el inconveniente de no poder realizarse en el terreno.

Parece que hay gran homología entre los antígenos de *W. bancrofti* y *Loa loa* por lo que la utilidad de estos tests es limitada en las zonas de co-endemia. Hasta el momento no hay tests de detección de antígeno para *Brugia* spp..

En el Centro nacional de Microbiología se realiza la detección de dos antígenos específicos de *Wuchereria* mediante un ELISA no comercial.

4.1.3.4 Detección de ácidos nucleicos

Las técnicas moleculares ofrecen mayor sensibilidad y especificidad que cualquiera de las técnicas descritas anteriormente. Se ha demostrado que pueden detectar las filarias linfáticas en sangre no recogida durante la noche, y que también son capaces de detectar los pacientes amicrofilarémicos. Además, son capaces de distinguir los tres tipos de filarias linfáticas con buena especificidad, a diferencia de los tests de detección de antígeno que van más dirigidos a *W. bancrofti*. Las nuevas técnicas isotérmicas (LAMP) ofrecen mayor facilidad de uso en áreas endémicas y menores costes que la PCR convencional o a tiempo real.

4.2 ONCOCERQUIASIS

4.2.1 Características generales

La oncocerquiasis es una infección parasitaria producida por el nematodo tisular *Onchocerca volvulus*, que afecta aproximadamente a 18 millones de personas, y 187 millones viven en áreas con riesgo de padecerla. Las zonas endémicas se encuentran fundamentalmente en África subsahariana, aunque también hay focos aislados en Brasil, Venezuela y en Yemen. Millones de personas han sido tratadas con ivermectina gracias a los programas internacionales de control de *Onchocerca* spp. Al ser un fármaco sólo microfilaricida hay que

suministrarlo durante más de 20 años para que sea eficaz. Se ha probado con doxiciclina que al matar el endosimbionte *Wolbachia* se esteriliza a la hembra, disminuyendo la transmisión y produciendo finalmente la muerte del adulto, pero los largos tiempos necesarios de uso de este antibiótico (6 semanas) y su contraindicación en niños y embarazadas hacen que no sea útil en tratamientos de masas. Gracias a estos programas, Colombia, Ecuador, Méjico y Guatemala han sido recientemente declarados libres de oncocerquiasis por la OMS y esta enfermedad está en vías de eliminación en Sudan, Senegal, Mali y algunas áreas de Uganda (Figura 30).

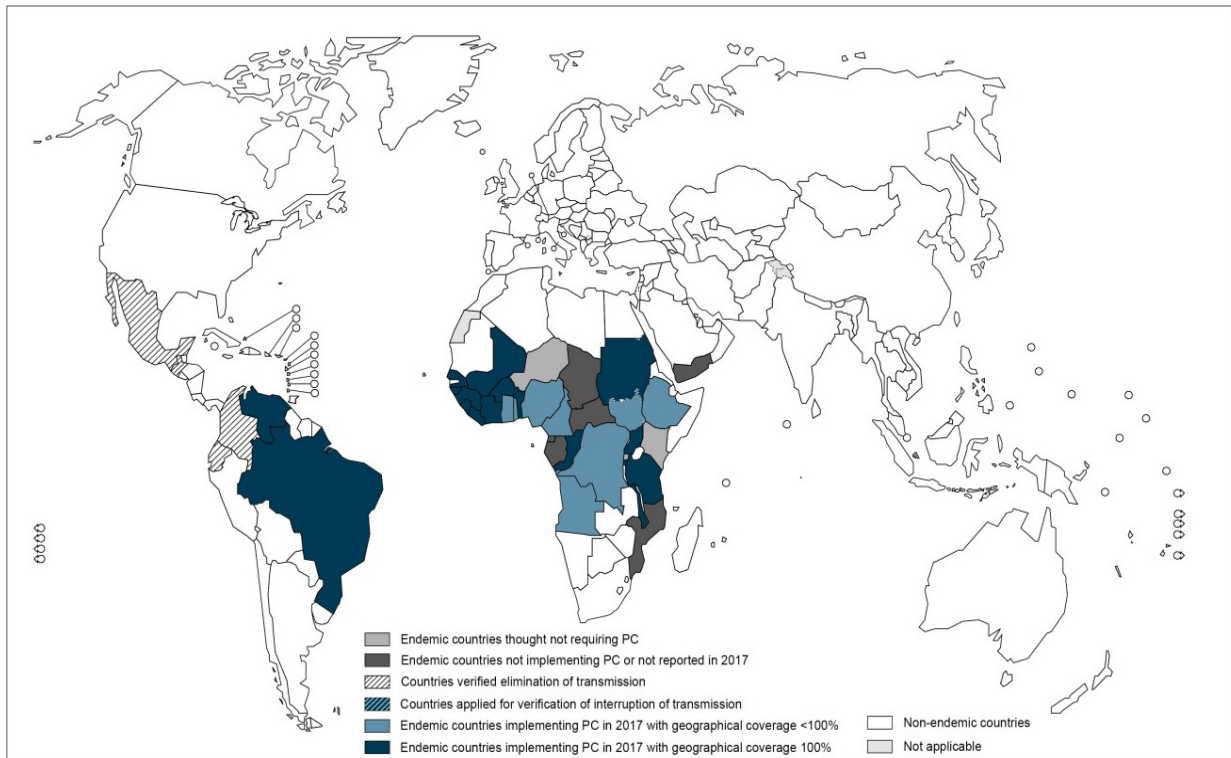


Figura 30. Distribución geográfica de la oncocerquiasis en 2017. (Tomado de la WHO: www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/onchocerciasis)

4.2.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos

La oncocerquiasis se transmite por la picadura de moscas del género *Simulium*, que se cría en los ríos de aguas rápidas, infectando durante el día a la gente que vive en pueblos cercanos a la rivera. Con la picadura, la mosca inyecta la larva del tercer estadio, que en el tejido subcutáneo se transforma en adulto entre 6 y 12 meses después y produce entre 1.000 y 3.000 microfilarias al día que son liberadas al tejido subcutáneo y a los ojos, produciendo una respuesta inflamatoria crónica. La sintomatología de la enfermedad tarda en aparecer meses o años, y sólo se observan en personas que han sufrido múltiples picaduras infectivas.

La filaria adulta puede vivir más de 15 años en el huésped, formando nódulos fibrosos llamados oncocercomas, en el tejido subcutáneo y el periostio donde se alojan los gusanos adultos de ambos sexos, predominantemente en la cintura pélvica y extremidades inferiores en la forma africana y en cabeza y hombros en la americana. Las microfilarias son las responsables del resto de la clínica, debido a la intensa respuesta inflamatoria que producen cuando mueren, y en menor medida a las endotoxinas de las bacterias del género *Wolbachia* que viven en su superficie. Así la sintomatología predominante es la cutánea, produciendo prurito generalizado y alteraciones de la pigmentación (“piel de leopardo”), edema y atrofia con aspecto de envejecimiento prematuro de la piel. En las zonas de la sabana seca africana produce, con más frecuencia que en otras zonas y debido a la migración de las microfilarias al ojo, afectación ocular con queratitis, coriorretinitis y neuritis óptica que

conducen a la ceguera de forma irreversible. De ahí el nombre que recibe la enfermedad de “ceguera de los ríos”. Es la segunda causa infecciosa de ceguera después del tracoma, y se estima que 270.000 personas están ciegas a causa de la oncocerquiasis y que 6,5 millones sufren patología cutánea severa.

4.2.3 Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico microbiológico se hace tras la detección de microfilarias en muestras de piel (técnica del pellizco cutáneo) en solución salina tras la visión microscópica o por técnicas moleculares, por técnicas serológicas y en ocasiones mediante un test de provocación con dietilcarbamacina (DEC): test de *Mazzotti*. En los nódulos extirpados pueden detectarse los gusanos adultos. Otros signos diagnósticos son la presencia de microfilarias móviles en la córnea y cámara anterior del ojo que miden de 0,2 a 0,3 mm, observadas con lámpara de hendidura. El hecho de que millones de personas en África vivan en áreas donde *Onchocerca* spp., *Loa loa* y *Mansonella* spp. son co-endémicas hace más difícil el diagnóstico.

4.2.3.1 Examen microscópico

Para este examen, se cogen de 4 a 6 pellizcos cutáneos (*skin snips*) en varias zonas corporales (crestas ilíacas posteriores y gemelos en pacientes africanos y escápulas y lóbulos auriculares en pacientes americanos). Se realizan con un punch o con un bisturí, elevando la zona de la dermis con una aguja subcutánea e intentando que sea lo más exangüe posible. Las muestras se colocan en un portaobjetos con una gota de suero salino y se observan al microscopio con bajo aumento o a la lupa pasados unos minutos buscando microfilarias que salgan del pellizco cutáneo. Si el resultado es negativo, se incuba el portaobjetos 24 horas en cámara húmeda a 37°C y se vuelve a observar al microscopio pasado ese tiempo. Las microfilarias que se observen se cuentan al microscopio y se pesa el pellizco para calcular el número de microfilarias por mg de piel.

Las microfilarias que se observan en los pellizcos cutáneos se pueden confundir con otras filarias cutáneas (*Mansonella streptocerca*), con *Loa loa* o con diferentes especies sanguíneas de *Mansonella*, fundamentalmente cuando la cantidad de microfilarias en sangre es alta. Por eso es importante teñir con Giemsa las muestras que sean positivas para observar las características diferenciales de cada una de ellas o realizar técnicas moleculares más específicas de especie (ver **Tabla 3**).

Esta técnica es invasiva y poco sensible en infecciones tempranas y cuando la intensidad de la infección es baja, situación muy frecuente últimamente gracias a las campañas de erradicación. Hasta hace poco era considerada el *gold-standard* por su alta especificidad (cercana al 100%), pero últimamente ha sido desplazada por las técnicas moleculares debido a su menor sensibilidad (29-76% según la zona).

4.2.3.2 Técnicas serológicas

Estas técnicas detectan anticuerpos IgG4 frente al antígeno recombinante Ov16 de *O. volvulus*, antígeno presente en todos los estadios de *Onchocerca* spp. que genera presencia de anticuerpos antes de que haya microfilarias en la piel. La detección de IgG4 se demostró más específica que la de IgG total y la OMS recomienda su uso en niños menores de 5 años para confirmar la erradicación en zonas después de los tratamientos de masas. Está disponible en formato de ELISA (sensibilidad del 75-85% y especificidad mayor al 99%) y hasta hace poco tiempo en forma de test rápido (Abbott), con una sensibilidad del 80% y una especificidad del 95-99%. Su principal ventaja frente a la detección microscópica o molecular en *skin snips* es su rapidez, sencillez y mayor sensibilidad en infecciones tempranas. Además, parece que tiene tendencia a negativizar tras el tratamiento, aunque no hay estudios concluyentes que lo demuestren. Como inconveniente no distingue entre infección pasada, activa o en periodo prepatente. Hay un 20% de personas infectadas que, por algún tipo de variación genética, no desarrollan anticuerpos frente al Ov16, por lo que se están desarrollando tests serológicos con combinaciones de antígenos (Ov16 y OVOC3261) que intenten detectar a esa población. Se

han descrito reacciones cruzadas con *Strongyloides* spp. y con otras filarias, principalmente con *Mansonella ozzardi*.

También existen tests rápidos que detectan anticuerpos IgG4 frente al antígeno Ov16, junto con el antígeno Wb123 de *Wuchereria bancrofti*, (SD Bioline Onchocerciasis/LF IgG4 Rapid Test Wb123/Ov16 test) con sensibilidades y especificidades similares a las de los tests independientes (84% y 98-99% respectivamente).

4.2.3.3 Detección de ácidos nucleicos

Existen técnicas de amplificación de ácidos nucleicos que detectan la secuencia O-150 en los pellizcos cutáneos con buena sensibilidad y especificidad. Secuencia de 150 pares de bases que está presente en otras especies del género *Onchocerca*, pero no en otras filarias humanas. Hay técnicas disponibles en formato de PCR a tiempo real y en formato LAMP, con una gran sensibilidad, siendo capaces de detectar hasta un solo parásito en la muestra. Actualmente es considerada la técnica gold estándar en el diagnóstico de la oncocerciasis por la OMS pero suele estar disponible sólo en centros de referencia.

En el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III se realiza una nested-PCR frente a la región ITS1 del gen ribosomal de varias filarias (*Loa loa*, *Onchocerca* spp., *Mansonella* spp. y *Dirofilaria* spp.). El tamaño de esta región varía según la especie, aun así, posteriormente se procede a la secuenciación del resultado de amplificación para confirmar la especie.

No existen técnicas, hasta la fecha, que sean capaces de detectar la presencia de la filaria adulta. Hay estudios en marcha buscando antígenos y material genético en sangre. Sería muy útil para pacientes con escasa carga parasitaria y aquellos bajo tratamiento con ivermectina, que sólo mata microfilarias pero no al adulto.

4.2.3.4 Otras técnicas diagnósticas

Test de Mazzotti: consiste en la aplicación tópica de 50-100 mg de dietilcarbamacina (DEC) y evaluación de la zona en 24-48 horas. La presencia de un rash papular sugiere la presencia la infección por *Onchocerca* spp. debido a la reacción inflamatoria causada por la muerte de las microfilarias en la piel. También puede realizarse con una dosis baja, vía oral de DEC. Es menos invasivo que los *skin snips*, pero con sensibilidades que varían entre un 36-83% según con qué técnica se compare (microscopía vs. PCR). La especificidad no es lo suficientemente alta como para ser usado como un test único en zonas con baja prevalencia y en ocasiones puede tener efectos secundarios importantes.

Existen técnicas en desarrollo de detección de ciertos biomarcadores en orina como el metabolito N-acetil-tiramina-O, β -glucuronido (NATOG), con el objetivo de distinguir el estadio de la infección en función de la concentración del metabolito detectada. Se ha visto que el punto de corte de 13 μ M puede ser útil para predecir la presencia de parásito viable con altos niveles de microfilarias, aunque no hay estudios concluyentes sobre su utilidad. Se han observado reacciones cruzadas con otras filarias, sobre todo con *Loa loa* y diferente comportamiento de este metabolito en cepas de *Onchocerca* spp. africanas y americanas.

4.3 LOASIS

4.3.1 Características generales

Loa loa es una filaria transmitida por la picadura de moscas del género *Chrysops* que está distribuida ampliamente por las zonas húmedas de África Central y el oeste de África, donde se estima que hay al menos 10 millones de personas infectadas (**Figura 31**). Tras la picadura infectiva, la larva madura en el tejido celular subcutáneo a filaria adulta y comienza a producir microfilarias que pasan a la sangre a partir de los 6-12 meses. Son las únicas filarias que no albergan bacterias del género *Wolbachia* en su cubierta.

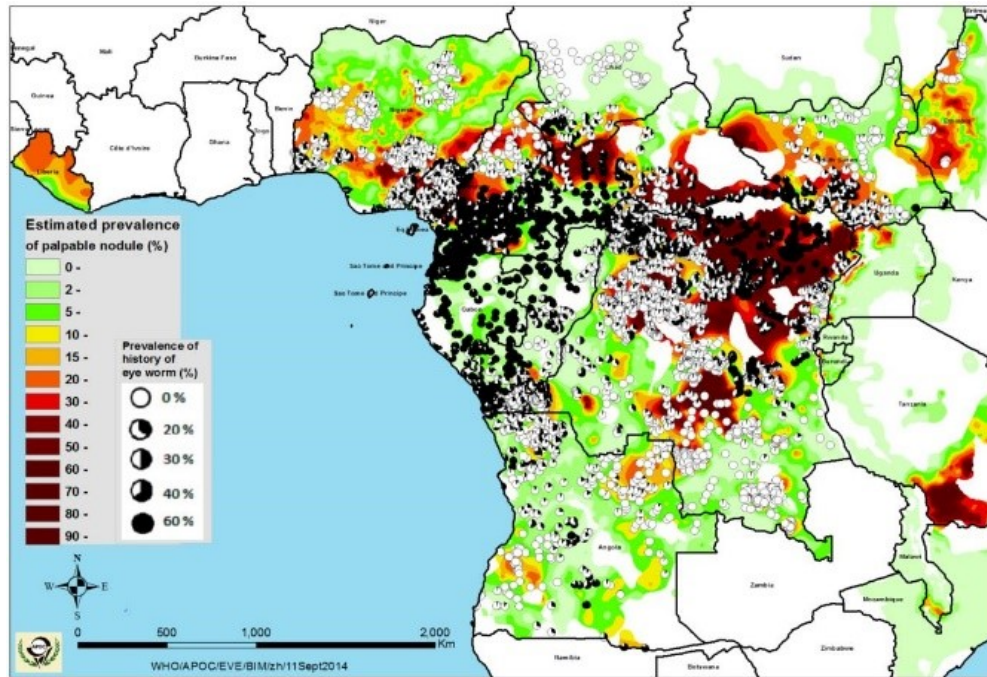


Figura 31. Distribución geográfica de la loasis. Tomado de: WHO. En: <https://www.who.int/apoc/raploa/en/>

Debido a que la mayoría de los casos en personas de área endémica son asintomáticos, se considera una enfermedad benigna y no está incluida dentro de la lista de enfermedades olvidadas de la OMS (*Neglected Tropical Diseases*). Se considera un problema de salud pública debido a que comparte áreas de endemicidad con *Onchocerca* spp. y con ciertas filarias linfáticas, produciendo problemas en los programas de erradicación de estas dos infecciones, ya que las personas con microfilaremias altas de *Loa loa* pueden sufrir graves efectos secundarios (encefalopatía principalmente) cuando se les trata con ivermectina o dietilcarbamacina, los dos fármacos usados frente a *Onchocerca* spp. y filarias linfáticas. Hasta la fecha no existen programas de erradicación de *Loa loa*.

4.3.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos

La enfermedad se caracteriza por la migración de la filaria adulto a través de los tejidos subcutáneos y profundos causando tumefacciones transitorias, dolorosas y pruriginosas de cara o extremidades (que se denominan edemas de Calabar y es más frecuente en expatriados que en nativos), conjuntivitis (al pasar el gusano adulto por el ojo) y eosinofilia. La mayoría de los individuos infectados están completamente asintomáticos y en áreas endémicas alrededor de dos tercios de los pacientes infectados no presentan microfilarias en sangre periférica (loasis oculta). También se ha descrito dolor articular y fatiga asociada a la infección, así como problemas renales, cardíacos y neurológicos que conllevan una menor esperanza de vida. En raras ocasiones puede producir fibrosis endomiocárdica y encefalopatía.

4.3.3 Diagnóstico de laboratorio

Para el diagnóstico se buscarán las microfilarias, mediante técnicas de concentración y visualización al microscopio, en sangre periférica extraída a mediodía (entre las 10 h y las 14 horas), que es el momento en el que las microfilarias son liberadas a sangre periférica. La búsqueda de microfilarias de *Loa loa* es difícil por dos razones: sólo pueden verse en sangre periférica en una ventana horaria específica, y más de la mitad (80% viajeros y 20% residentes en área endémica) de los pacientes infectados son amicrofilarémicos, es decir, tienen el gusano adulto, pero no liberan microfilarias detectables en sangre periférica en ningún momento.

En ocasiones la filaria adulta de *Loa loa* atraviesa el globo ocular por debajo de la conjuntiva, pudiendo ser extraída e identificada si se observa en ese momento (mide de 3 a 7 cm). En ocasiones puede pasar desapercibida por el propio paciente

4.3.3.1 Examen microscópico

Como ya se ha descrito anteriormente, la sangre se debe extraer alrededor de las 12 del mediodía que es cuando hay mayor cantidad de microfilarias en sangre periférica. Aun así, la mayoría de las veces la cantidad de microfilarias es baja por lo que hay que recurrir a técnicas de concentración como las descritas para las filarias linfáticas. La más usada es la técnica de concentración de Knott aunque existen muchas otras posibles (ver PNT-PI-05 de este procedimiento).

Una vez observada la microfilaria hay que teñirla con Giemsa o hematoxilina-eosina para observar las características típicas de *Loa loa* que permitan distinguirla de otras filarias, fundamentalmente la presencia de vaina (se observa mejor con hematoxilina-eosina) y la presencia de núcleos hasta la cola. (ver **Tabla 3** para la diferenciación de las filarias).

Además, es importante cuantificarlas para predecir el riesgo de efectos secundarios con el tratamiento. No hay estudios concluyentes sobre cuál es la microfilaremia de riesgo, pero parece que pacientes con más de 8.000 microfilarias/mL están en mayor riesgo de desarrollar efectos secundarios.

4.3.3.2 Técnicas serológicas

Existen diferentes técnicas serológicas que detectan anticuerpos circulantes de *Loa loa*. En general son sensibles, pero poco específicas (se han visto reacciones cruzadas principalmente con otras filarias y con *Strongyloides stercoralis*), y en la mayoría de los casos no distinguen entre infección activa o pasada, ya que los anticuerpos permanecen positivos por largos periodos de tiempo.

Técnicas serológicas que tratan de mejorar la especificidad son aquellas frente a un antígeno recombinante L1-SXP-1 (sensibilidad: 56-67%, especificidad: 81-98%). Es una proteína de 168 aminoácidos de función desconocida, liberada por todos los estadios de *Loa loa*, y con cierta homología con otras proteínas de la misma familia de otras filarias. Hay técnicas que detectan IgG total, pero la detección de IgG4 es más específica de infección activa que la IgG total (aumento de la especificidad al 99% con respecto a otras filarias), y parece ser el mejor marcador de loasis activa. Además, es útil en pacientes amicrofilarémicos ya que es positiva también en pacientes sin microfilarias en sangre, por lo que detectaría más pacientes que la microscopía.

Se ha probado en diferentes formatos: en ELISA (sensibilidad: 56%, especificidad: 98%), en LIPS (inmuno-precipitación de luciferasa; sensibilidad: 93-100%, especificidad: 97-100%, con IgG total o con IgG4) o en LFA (*lateral flow assay*. Sensibilidad: 94%, especificidad: 82-100% según frente a qué filaria se compare). Este último sólo está disponible para uso en investigación (RUO), usado en el terreno en el formato ICT para fines epidemiológicos, pero no recomendado todavía para diagnóstico. Su principal limitación es la reacción cruzada con otros antígenos de filarias y su principal ventaja es que, aunque no distingue entre infección pasada o activa, sí que detectaría los pacientes amicrofilarémicos.

4.3.3.3 Técnicas de detección de antígeno

Sería más útil la determinación antigénica en un formato de *point of care* para usar en terreno en las zonas de co-endemia con *Onchocerca* spp. y con *Wuchereria* spp., pero actualmente sólo hay tests disponibles para la detección de filarias linfáticas. Se obtuvieron buenos resultados con una detección antigénica en formato PEG-ELISA, pero con muchas reacciones cruzadas con otras filarias. Hay estudios prometedores con el antígeno LOAG_16297 en formato LIPS, con el que se ha observado una buena correlación con la cantidad de microfilarias en sangre y con muy buena especificidad (96%).

4.3.3.4 Detección de ácidos nucleicos

Las filarias son organismos multicelulares con ADN mitocondrial y nuclear, el mitocondrial es más pequeño y se destruye en una hora más o menos, pero el nuclear es más grande y más estable, por lo que se cree que es el que se detecta molecularmente en sangre incluso fuera de la periodicidad de las microfilarias y que es liberado tanto por microfilarias como por el adulto. Las técnicas moleculares, bien por PCR a tiempo real o por técnicas de LAMP adaptadas para hacer en el terreno, ofrecen una buena alternativa a las técnicas microscópicas, ofreciendo buena sensibilidad y especificidad.

La detección de una región repetida (15r3) de un gen de 15-kDa de *Loa loa* ha sido descrito como especie específico y capaz de detectar la loasis oculta con una sensibilidad del 95% y una especificidad del 100%. El uso de una *nested-PCR* mejoró los resultados, así como el uso de una PCR cuantitativa para cuantificar el número de microfilarias.

El uso de estas técnicas moleculares suele estar restringido a centros especializados de referencia. En España, como se ha indicado anteriormente, se realizan en el Centro Nacional de Microbiología, donde se realiza una *nested-PCR* frente a la región ITS1 de filarias (*Loa loa*, *Onchocerca* spp., *Mansonella* spp. y *Dirofilaria* spp.) con posterior secuenciación del resultado de amplificación para confirmar la especie.

4.4 PARASITACIÓN POR MANSONELLA SPP.

4.4.1 Características generales

El término mansonelosis se usa para nombrar la infección por tres especies del género *Mansonella* que infectan al ser humano: *M. perstans*, *M. ozzardi* y *M. streptocerca*. Son las filarias más frecuentes y las menos estudiadas, convirtiéndose en unas de las enfermedades tropicales más olvidadas dentro de las olvidadas. Las tres son transmitidas por mosquitos del género *Culicoides*, y *M. ozzardi* además puede ser transmitida por moscas del género *Simulium* o por otros mosquitos no-*Culicoides*.

4.4.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos

Causan poca sintomatología y se acompañan de eosinofilia y aumento de la IgE. Aunque pocos síntomas se han asociado claramente con la infección por *Mansonella* spp., parece que pueden producir síntomas inespecíficos secundarios a la respuesta inmune (prurito, artralgias y edemas cutáneos transitorios). Además, se ha visto que pueden alterar la respuesta inmune alterando la gravedad de otras infecciones como la infección por el VIH, malaria o tuberculosis.

M. perstans es la más frecuente de las tres y se encuentra principalmente en África tropical y se han descrito casos esporádicos en América Central y Sudamérica, por lo que es necesario saber distinguirla de *Loa loa* y de *Wuchereria bancrofti*. Se estima que infecta a 114 millones de personas en 33 países, y aunque se considera poco grave, se han descrito síntomas importantes asociados a su infección (pericarditis, pleuritis, rash cutáneo). En la **Figura 32** se presenta la distribución geográfica de la parasitación por *Mansonella* spp.



Figura 32. Distribución geográfica de la parasitación por *Mansonella* spp. Modificado de: Ta-Tang TH, et al., Mansonellosis: Current Perspectives. Res Rep Trop Med. 2018 Jan 18;9:9-24; doi: 10.2147/RRTM.S125750. eCollection 2018.

M. ozzardi es endémica de América Central y Sur América, desde el sur de Méjico al noroeste de Argentina, con excepción de Uruguay, Paraguay y Chile, por lo que será importante distinguirla de *Wuchereria bancrofti*. En Brasil se han descrito pacientes con lesiones corneales en relación con la infección por esta especie de *Mansonella*, así como la presencia de dolores articulares y cefalea.

M. streptocerca se encuentra en la piel, exclusivamente en pacientes de la zona central y oeste de África, por lo que habrá que diferenciarla principalmente de *Onchocerca* spp. No está claramente demostrado si produce lesiones cutáneas como dermatitis crónica papular o no.

4.4.3 Diagnóstico de laboratorio

En general los adultos de *Mansonella* spp. son casi imposibles de recuperar, por lo que es raro detectarlos y usarlos como método diagnóstico. Por ejemplo, los adultos de *M. perstans* se encuentran en las cavidades como pericardio, peritoneo, etc. Por tanto, el diagnóstico se realiza al identificar las microfilarias observadas en sangre periférica, extraída sin una periodicidad concreta, o en piel para *M. streptocerca* con *skin snips*. El diagnóstico en sangre periférica se realiza tradicionalmente con un estudio de gota gruesa, con lo que se ha visto que se subestima mucho el diagnóstico al compararlo con técnicas de biología molecular.

4.4.3.1 Examen microscópico

Las especies de *Mansonella* sanguíneas se diagnostican por tanto con extracción de sangre periférica con anticoagulante y realización de una gota gruesa o extensión, o tras métodos de concentración de la sangre. Posteriormente se tiñen con Giemsa o con hematoxilina y se observan las características diferenciales con el resto de las especies, observándose principalmente el tamaño, la presencia o no de vaina, y los núcleos al final de la cola. En general las microfilarias de *Mansonella* spp. no tienen vaina y son aperiódicas.

M. perstans se distingue fácilmente de *Loa loa* y de *Wuchereria bancrofti* por ser más pequeña, por no tener vaina y por la presencia de núcleos grandes al final de la cola. *M. ozzardi* es también más pequeña que las filarias linfáticas, no tiene vaina y no tiene núcleos al final de la cola. Esta especie puede observarse en ocasiones en muestras cutáneas, siendo más difícil diferenciarla de *Onchocerca* spp..

Para el diagnóstico de *M. streptocerca* se realizan *skin snips* igual que con *Onchocerca* spp., diferenciando las microfilarias de ambas especies porque las de *M. streptocerca* son más pequeñas y más finas, tienen la cola curvada y presentan núcleos hasta el final de la misma.

4.4.3.2 Detección de ácidos nucleicos

Existen diferentes PCRs en desarrollo en diferentes formatos (*nested*-PCR, PCR a tiempo real o LAMP), cuya diana es la región ribosomal ITS-1, pero hasta la fecha no hay ninguna comercializada. Como se ha indicado previamente, en el Centro Nacional de Microbiología se realiza una *nested*-PCR capaz de detectar *Mansonella* spp. entre otras filarias.

4.5 FILARIASIS AUTÓCTONAS DE EUROPA (DIROFILARIASIS)

4.5.1 Características generales

La dirofilariasis es una infección causada por nematodos del género *Dirofilaria*, siendo *D. repens* y *D. immitis* las dos especies más frecuentemente encontradas en Europa. Son transmitidas por mosquitos del género *Anopheles*, *Culex* o *Aedes*, y su hospedador definitivo es el perro. El ser humano puede ser infectado accidentalmente, pero en él, el parásito rara vez va a adquirir la madurez sexual.

4.5.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos

Hasta finales del siglo XX, *Dirofilaria* spp. se encontraba casi exclusivamente en países de la cuenca mediterránea, pero con el calentamiento global se han empezado a describir casos en el centro y este de Europa, por lo que ha sido calificada como una enfermedad emergente en Europa. Europa, por lo que ha sido calificada como una enfermedad emergente en Europa.

En el hombre, *D. repens* suele producir dirofilariasis cutánea y ocular, observando nódulos subcutáneos únicos o múltiples, generalmente en la parte superior del cuerpo cursando de manera asintomática, pero en ocasiones se han descrito en cavidades simulando un tumor. *D. immitis* produce dirofilariasis pulmonar, en forma de nódulos pulmonares reactivos a la muerte de las filarias que llegan a la arteria pulmonar.

4.5.3 Diagnóstico de laboratorio

En humanos generalmente no se desarrolla a gusano adulto, por lo que no tiene la capacidad para producir microfilarias. Aunque es extremadamente raro, se han descrito casos aislados con microfilaremia positiva.

4.5.3.1 Examen microscópico

Si se observan nódulos subcutáneos, su extirpación y posterior visualización del nematodo adulto al microscopio en cortes histológicos permitirá distinguir las dos especies de *Dirofilaria*. *D. repens* presenta una cutícula gruesa, con nervaduras triangulares en su superficie y unas cuerdas laterales características. Sin embargo *D. immitis* tiene la cutícula lisa, fina y sin cuerdas laterales. Los adultos de *D. immitis* suelen ser más difíciles de identificar porque al ser los nódulos pulmonares más asintomáticos, cuando se encuentran y se extraen la estructura parasitaria suele estar destruida.

Aunque raro, se han descrito casos en los que se han observado microfilarias en sangre periférica extraída a primera hora de la mañana (la máxima microfilaremia en perros se ha visto que es a las 2.30 horas). Las microfilarias de *D. repens* son largas (350-385 µm de largo), en el polo frontal se ven dos núcleos separados de la columna de núcleos central y a unas 3 µm del espacio cefálico frontal, y la cola es curvada. *D. immitis* tiene microfilarias más cortas (290-330 µm de largo), no presenta núcleos dispersos, la columna de núcleos comienza unas 7 µm del espacio cefálico frontal y la cola es recta.

Tabla 3. Características diferenciales de las filarias

Especie	<i>Loa loa</i>	<i>Onchocerca</i>	<i>Wuchereria bancrofti</i>	<i>Brugia malayi</i>	<i>Brugia timori</i>	<i>Mansonella perstans</i>	<i>Mansonella streptocerca</i>	<i>Mansonella ozzardi</i>
Distribución geográfica	África central y oeste	África y América	Casi todas las zonas tropicales y subtropicales	Asia, India, Indonesia, Malasia, Filipinas e islas del Pacífico	Islas Timor e Indonesia	África tropical. Casos esporádicos en América Central y Sur América	Zona central y oeste de África	América Central y Sur América
Vector	<i>Chrysops</i>	<i>Simulium</i>	<i>Culex</i> , <i>Anopheles</i> , <i>Aedes</i> y <i>Mansonia</i>	<i>Culex</i> , <i>Anopheles</i> , <i>Aedes</i> y <i>Mansonia</i>	<i>Culex</i> , <i>Anopheles</i> , <i>Aedes</i> y <i>Mansonia</i>	Mosquitos del género <i>Culicoides</i>	Mosquitos del género <i>Culicoides</i>	<i>Simulium</i> , Mosquitos del género <i>Culicoides</i> y no- <i>Culicoides</i>
Hábitat de forma adulta	Tejido subcutáneo, conjuntiva	Tejido subcutáneo profundo	Sistema linfático	Sistema linfático	Sistema linfático	Sangre	Dermis	Tejido subcutáneo
Hábitat de la microfilaria	Sangre	Piel	Sangre	Sangre	Sangre	Sangre	Piel	Sangre*
Periodicidad	diurna	no	nocturna	nocturna	nocturna	no	no	no
Vaina	si	no	si	si	si	no	no	no
tamaño	Larga y ancha. 250-300x 8-10 µm	Larga y ancha. 240-360x 5-9 µm	Larga y ancha 275-300x 8-10 µm	Larga y ancha 200-275x 5-6 µm	Larga y ancha 290-325x 5-6 µm	Corta y fina. 190-240x4,5 µm	Corta y fina. 180-240x4,5 µm	Corta y fina. 150-200x4,5 µm
Cuerpo y cola	Numerosas curvas, núcleos densos hasta el final. Cola redondeada.	No núcleos al final de la cola, ésta es puntiaguda	Pocas curvas, menos núcleos, no llegan al final. Cola apuntada.	Dos núcleos al final de la cola claramente separados.	Dos núcleos al final de la cola claramente separados. Más larga que <i>B. malayi</i> , núcleos menos densos y mayor espacio en la cabeza	Núcleos hasta el final de la cola que es redonda	Núcleos hasta el final de la cola que es redonda y generalmente curvada	No núcleos en el final de la cola. La cola es puntiaguda

*vive en los capilares cutáneos por lo que también se puede encontrar en la piel.

5. INTRODUCCIÓN

Las parasitosis intestinales, a diferencia de las hemáticas y tisulares, no se han incrementado de forma tan notable. Se podrían diferenciar cinco grandes grupos pacientes, i) la población infantil local, en la que se sigue diagnosticando, con cierta frecuencia, patógenos como *Enterobius spp.*, *Cryptosporidium spp.* y *Giardia spp.*; ii) la población adulta autóctona inmunocompetente, en la que las parasitosis intestinales son menos frecuentes, a excepción algunas zoonosis o las transmitidas por alimentos importados; iii) la población inmuno-deprimida, donde en los infectados por el VIH y en los sometidos a los tratamientos CART las parasitosis han disminuido drásticamente, a diferencia de los inmunodeprimidos por otras causas, en los que se siguen diagnosticando; iv) la población de viajeros a zonas endémicas, que puntualmente puede adquirir un patógeno entérico, siendo la mayoría de las veces bacteriano y con menos frecuencia parasitario y iv) el grupo población de migrantes que en la actualidad son portadores de un menor número de helmintos intestinales, aunque no se deben olvidar aquellos que cronifican como el *Strongyloides stercoralis*.

El diagnóstico microbiológico de los parásitos intestinales sigue manteniendo muchos de los procedimientos clásicos, y aunque cada día se tiende más hacia el diagnóstico de enteropatógenos con paneles sindrómicos moleculares, estos todavía no están disponibles para todos los parásitos intestinales.

Por ello en este procedimiento se revisan los procedimientos convencionales, así como las novedades incorporadas para el diagnóstico de las parasitosis intestinales.

6. PRINCIPIOS GENERALES DEL DIAGNÓSTICO

6.1 RECOGIDA Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

Este apartado está ampliamente desarrollado en el procedimiento microbiológico: Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b.

(<https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1b.pdf>)

A continuación, se describen consideraciones particulares que permiten realizar un diagnóstico parasitológico adecuado.

6.1.1 Muestras de heces

Para realizar el estudio coproparasitológico en fresco, la muestra debe recogerse en un frasco limpio y seco evitando mezclar las heces con la orina, así como la utilización de sustancias laxantes u otras que interfieran en la visualización correcta de la morfología de los parásitos. La cantidad recomendada es de 100 g en el caso de heces firmes o 10 ml si la consistencia es líquida. El procesamiento debe ser de inmediato (entre 2 y 4 horas).

Por el contrario, si el procesamiento de la muestra no va a ser inmediato, la muestra puede recogerse directamente en un recipiente que contenga sustancias fijadoras que impidan la destrucción de las formas parasitarias. Las sustancias fijadoras más utilizadas son derivadas del formaldehído como el propio formaldehído diluido al 10%, acetato sódico-ácido acético-formol (SAF), mertiolato-yodo-formaldehído (MIF), alcohol polivinílico (LV-PVA) u otras. En los últimos años y debido a la toxicidad de los derivados del formaldehído y de los derivados del mercurio, se han desarrollado otras sustancias fijadoras libres de estas sustancias.

Las muestras fijadas permiten realizar tanto técnicas de concentración como tinciones permanentes, en el caso de que sea necesario.

Un tema controvertido es cuando y como realizar el estudio coproparasitológico. El rendimiento diagnóstico en inmigrantes recién llegados es mucho mayor ya que la prevalencia de parásitos intestinales disminuye a

medida que aumenta el tiempo de residencia en el país de acogida, con algunas excepciones como en el caso de *Strongyloides stercoralis*, en el que la capacidad de autoinfestación hace que este helminto pueda detectarse muchos años después de la adquisición de la infección. Por ello, hay autores que defienden que el estudio coproparasitológico debe hacerse únicamente en los primeros 12 meses en ausencia de signos indirectos como la eosinofilia, mientras que otros lo amplían a tres o cinco años o incluso más tarde.

También es objeto de discusión el número de muestras que se deben examinar. El realizar un análisis seriado, aumentando el número de muestras (hasta tres) incrementa la sensibilidad del examen microscópico debido a que la eliminación de los parásitos en heces no es continua. Sin embargo, hay estudios que indican que el aumentar el número de muestras no se asocia significativamente con un aumento de la rentabilidad en el diagnóstico. Existen protocolos que recomiendan examinar una única muestra en inmigrantes asintomáticos sin eosinofilia, mientras que otros recomiendan de inicio la recogida de tres muestras obtenidas en días alternos para aumentar así el rendimiento de entidades como la giardiasis o la estrongiloidiasis, a pesar de aumentar el gasto y la carga de trabajo del laboratorio.

En el caso de utilizar la muestra para el examen de larvas es necesario que las heces no estén fijadas y se conserven a temperatura ambiente (22-35°C).

En el caso de utilizar la muestra para técnicas de detección de antígeno (ELISA o inmunocromatografía) las muestras deben ser frescas y mantenerse refrigeradas (2-8°C) o congeladas (-20°C). Algunos fijadores no derivados del formaldehído permiten utilizar esta muestra para la realización de técnicas de PCR.

6.1.2 Otras muestras

6.1.2.1 Suero

Se obtiene sangre sin anticoagulante y gel separador de la forma habitual para la realización de cualquier técnica serológica. La muestra debe centrifugarse para separar el suero lo antes posible y conservarse refrigerada hasta su procesamiento.

6.1.2.2 Orina

El estudio uroparasitológico tiene como objetivo descartar la infección por *Schistosoma haematobium*. Para ello debe recogerse un volumen mínimo de 100 mL de orina tras realizar ejercicio físico de tipo sentadillas o flexiones que favorezca el desprendimiento de los huevos de la pared de la vejiga, preferiblemente durante la mañana. En casos de alta sospecha diagnóstica, la recogida de muestras seriadas de orina o incluso de orina de 24 horas aumenta el rendimiento diagnóstico.

En el caso de no procesarse en pocas horas es aconsejable conservarla refrigerada.

6.1.2.3 Muestras menos frecuentes

- Esputo: la muestra se obtiene en un tubo limpio de boca ancha. La observación del sedimento del esputo puede permitir observar larvas de *S. stercoralis* en casos de hiperinfestación o de tremátodos como en el caso de la infección por *Paragonimus* spp.
- Material de absceso hepático: obtenido por punción de un absceso hepático de posible origen amebiano y transportado en tubo estéril sin conservante. Se realiza un examen en fresco del material del absceso donde se pueden observar los trofozoítos típicos de *Entamoeba histolytica*. Esta muestra también puede servir para la realización de técnicas de detección de antígeno o PCR.
- Líquido cefalorraquídeo: debe obtenerse en condiciones de esterilidad y transportarse de forma inmediata. Sirve para realizar examen en fresco o también puede utilizarse para PCR en el diagnóstico de absceso amebiano, neurocisticercosis, meningitis eosinofílica, u otras lesiones del sistema nervioso central.

6.2 OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

A pesar de los avances en el diagnóstico de parasitosis intestinales, el examen microscópico de las heces sigue siendo la técnica más utilizada.

El examen microscópico de la muestra en fresco permitirá observar el movimiento característico de los trofozoítos de los protozoos en el caso de muestras de pacientes con diarrea aguda, mientras que tiene menor sensibilidad en el caso de la detección de quistes de protozoos y/o huevos o larvas de helmintos. El procedimiento es muy sencillo y consiste en colocar una gota de la muestra con solución salina sobre un portaobjetos y la utilización de un colorante (Iugol es el más utilizado). Aunque los protozoos pueden verse a bajo aumento (10x), para poder medir las estructuras y observar correctamente los orgánulos en movimiento, el objetivo más indicado es el de 40x.

6.3 MÉTODOS DE CONCENTRACIÓN DE HECES

Los métodos de concentración son esenciales para aumentar la sensibilidad en la observación microscópica de quistes de protozoos y/o huevos o larvas de helmintos.

Se basan fundamentalmente en separar los elementos parasitarios de los residuos presentes en las heces para facilitar su identificación y concentrarlos con el objetivo de aumentar el rendimiento diagnóstico. El concentrado obtenido se observa al microscopio como un examen en fresco.

Se pueden utilizar varios métodos de concentración:

- Métodos de separación físico-químicos. Técnica de formol-éter o técnica de Ritchie: que utiliza el formol para homogenizar las heces, el éter como disolvente químico y finalmente concentra la muestra por centrifugación. Es la técnica de elección para la visualización de protozoos y/o huevos o larvas de helmintos en pacientes provenientes de áreas de alta prevalencia.

Existen modificaciones de esta técnica como la técnica de Blagg o MIF-concentración, que incluye como sustancia fijadora el MIF que aporta también coloración.

- Técnicas de flotación: utilizan soluciones altamente saturadas que facilitan la flotación de huevos de helmintos.

- Concentradores comerciales: provistos de una sustancia fijadora y que llevan incorporados una serie de filtros de distintos tamaños que aprovechan la centrifugación para concentrar la muestra separando los residuos.

La sensibilidad del examen microscópico al realizar la concentración mediante este tipo de dispositivos es menor en el caso de detección de helmintos que de protozoos (comunicación personal E. Sulleiro) a pesar de que se han utilizado con buenos resultados en la detección de huevos de helmintos en zonas de muy alta prevalencia.

- Técnica de Kato-Katz: aunque no es estrictamente una técnica de concentración, permite la visualización y cuantificación de huevos de helmintos en un frotis grueso de heces. Es la técnica de elección en los estudios de prevalencia y de evaluación de disminución de la carga parasitaria tras tratamientos masivos.

6.4 OTROS MÉTODOS

6.4.1 Estudios de larvas

Tienen como objetivo la observación de las larvas de *S. stercoralis* y en ocasiones de uncinarias

- Cultivo con carbón activado. Se basa en la utilización del carbón activado que al mezclarse con las heces en unas condiciones de humedad (papel secante siempre húmedo) temperatura (28-30°) y oscuridad, permite completar el ciclo completo de *S. stercoralis*. De esta forma se pueden observar en la zona húmeda los diferentes estadios larvarios e incluso formas adultas de este helminto. En caso de infección por uncinarias sólo se observan las formas larvarias. Las larvas, pueden ser aspiradas de la zona húmeda y al observarlas al microscopio es posible la diferenciación de las tres especies.

- Cultivo en agar. Permite observar el crecimiento de las bacterias de la microbiota intestinal que son arrastradas por las larvas por la superficie de un agar neutro. La muestra de heces se coloca directamente sobre la superficie del agar manteniéndose a temperatura ambiente y en oscuridad.
- Técnica de Harada-Mori. Consiste en la utilización de una tira de papel que se introduce en un tubo que contiene agua. La muestra se extiende en capa fina sobre el papel y se deja 24-48 horas a temperatura ambiente.

Las larvas presentes en la muestra migran a través de la tira de papel hasta el agua donde podrán aspirarse para su observación microscópica.

6.4.2 Tinciones

Los niños, pacientes inmunodeprimidos o situaciones especiales pueden requerir el cribado de coccidios (*Cryptosporidium* spp., *Cystoisospora* spp. y *Cyclospora* spp.). Para ello se realizan tinciones permanentes como la tinción de auramina, Ziehl-Neelsen modificada o tinción Kinyoun que permiten diferenciar su característica pared ácido-alcohol resistente.

Las tinciones pueden realizarse de muestra fijada e incluso concentrada, aumentando la sensibilidad del diagnóstico.

6.4.3 Técnicas de detección de antígeno

Son técnicas inmunológicas basadas en el reconocimiento específico de antígenos de los parásitos presentes en las heces por parte de anticuerpos monoclonales o policlonales fijados en un soporte sólido. Existen varios tipos de reactivos comerciales en formato de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o inmunocromatografía.

La utilización de estas técnicas permite detectar estos microorganismos con mayor sensibilidad y rapidez que el examen microscópico. Son muy útiles en el diagnóstico rápido de la diarrea aguda, así como en pacientes con sospecha clínica y examen microscópico negativo. No permiten detectar otros parásitos presentes en la misma muestra, por lo que la utilidad de estas técnicas en el cribado del paciente asintomático es menor.

6.4.4 Examen macroscópico

En ocasiones, se reciben en el laboratorio formas adultas que pueden estar completas o incompletas. Deben enviarse conservadas en alcohol de 70° para poder observar correctamente las estructuras que permitan su identificación: longitud, forma, segmentación, color, estructura interna, etc.

6.4.5 Técnicas moleculares

Existen múltiples protocolos de PCRs tanto convencionales como a tiempo real para el diagnóstico de parasitosis intestinales, algunos de ellos ya comercializados en paneles que permiten descartar varios agentes simultáneamente. La utilidad de estas técnicas en el cribado sistemático todavía está por determinar, pero su potencial interés radica en diagnosticar bajas cargas parasitarias, dada su alta sensibilidad, reduciendo así el tiempo de microscopía.

En los últimos años también se están desarrollando técnicas isotérmicas como el LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*) más sencillas y más económicas que la PCR, lo cual facilita su implementación en zonas endémicas de baja renta.

7. PROTOZOOS

Los protozoos son responsables de un importante número de gastroenteritis y otros síntomas gastrointestinales a nivel mundial. En el intestino es posible detectar especies de protozoos patógenas reconocidas (*Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis*, *Cystoisospora belli*), otras de menor o incluso controvertida patogenicidad (*Dientamoeba fragilis*, *Blastocystis hominis*) y por último, otras

no patógenas que es necesario diferenciar. Las técnicas clásicas basadas en el examen microscópico de las heces son las que se utilizan mayoritariamente para la detección de protozoos intestinales. También existen técnicas de detección de antígeno incluso en formato *point of care* que permiten realizar un diagnóstico rápido, aunque dirigido, y con una sensibilidad variable. Por último, se han desarrollado múltiples protocolos de PCR para la detección de la mayor parte de los protozoos que aumentan la sensibilidad en el diagnóstico disminuyendo la complejidad técnica y de interpretación de las técnicas clásicas.

7.1 AMEBIASIS

7.1.1 Características generales

Existen seis especies de amebas que pueden localizarse en la luz intestinal, de las cuales *Entamoeba histolytica* es la única considerada patógena. Presenta dos formas morfológicas, el trofozoíto que es la forma activa y el quiste que es la forma infectiva. El trofozoíto mide entre 15-20 μm se mueve mediante pseudópodos y presenta un núcleo característico con un cariósoma central. Por su parte, el quiste es de menor tamaño (10-15 μm), redondeado sin pseudópodos y en su interior se pueden observar de 2 a 4 núcleos. *E. histolytica* es indistinguible morfológicamente de otras dos especies no patógenas, *E. dispar* y *E. moshkovskii*, que son mucho más frecuentes que *E. histolytica*.

7.1.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos

E. histolytica presenta una distribución mundial, aunque su prevalencia es mayor en países con condiciones higiénicas deficitarias, tratamientos de agua inadecuados y bajo nivel socio-económico. La vía de transmisión es fecal-oral, por lo que además de la transmisión vehiculizada por alimentos o aguas, no deben descartarse otras vías de transmisión como las relaciones sexuales oro-anales, una de las causas más frecuentes de transmisión en países desarrollados.

El 90% de los pacientes infectados son portadores asintomáticos mientras que sólo el 10% presentarán clínica intestinal como colitis o disentería o de amebiasis extraintestinal. La primera se caracteriza por una diarrea invasiva, acuosa y con presencia de sangre, moco y pus.

Los trofozoítos de *E. histolytica* son capaces de atravesar la mucosa intestinal y producir infección extraintestinal en forma de absceso, principalmente en el hígado. En la mayor parte de ocasiones la presentación extraintestinal no se acompaña de disentería y no se observan trofozoítos ni quistes en heces.

7.1.3 Diagnóstico de laboratorio

7.1.3.1 Examen microscópico

El diagnóstico de la amebiasis se basa en la observación microscópica de los trofozoítos y/o quistes de *E. histolytica*.

El examen directo con suero salino de las heces diarreicas permite observar los trofozoítos con el movimiento característico de los pseudópodos. En ocasiones es posible observar hematíes fagocitados en su interior, lo cual es indicativo de *E. histolytica*.

En caso de no procesarse inmediatamente, las heces deben fijarse y utilizar una técnica de concentración aumentando la posibilidad de visualizar los quistes. Existen tinciones como el tricrómico o la hematoxilina que favorecen la visualización de las estructuras características pero que generalmente no son utilizadas de rutina en los laboratorios de diagnóstico.

El examen microscópico a pesar de ser ampliamente utilizado, presenta una sensibilidad limitada y requiere de observadores experimentados ya que en ocasiones es difícil de distinguir de otras especies no patógenas pero frecuentes como *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Endolimax nana* o *Iodameba butschlii*.

E. histolytica es indistinguible microscópicamente de *E. dispar* y *E. moshkovskii*, por lo que es necesario realizar técnicas de detección de antígeno o moleculares que permitan hacer un diagnóstico correcto.

A pesar de ser la técnica de elección en el diagnóstico de los protozoosis intestinales, el examen microscópico requiere tiempo, experiencia y presenta una sensibilidad limitada muy ligada al observador.

7.1.3.2 Pruebas de detección de antígeno

Las técnicas de detección de antígeno deben realizarse en heces frescas, en caso de demora en su procesamiento deben mantenerse congeladas.

Existen múltiples técnicas de detección de antígeno, principalmente en formato ELISA que utilizan anticuerpos monoclonales frente antígenos específicos de *E. histolytica* como la Gal/GalNAc-lecitina específica. Es una técnica sencilla y en muchos laboratorios es la técnica utilizada para diferenciar esta especie de *E. dispar* y *E. moshkovskii* cuando se observan quistes en heces. La sensibilidad y especificidad de esta técnica es muy diferente para las diferentes técnicas, pero en general mejora la del examen microscópico, pero no alcanza la de las técnicas moleculares. Algunas de estas técnicas pueden ser utilizadas también en muestras de pus de absceso.

También existen técnicas inmunocromatográficas, incluso en formatos que detectan simultáneamente otros protozoos como *Giardia intestinalis* o *Cryptosporidium* spp., utilizando anticuerpos específicos frente a cada uno de ellos. Son técnicas sencillas y rápidas pero como inconveniente muchas de ellas no permiten diferenciar *E. histolytica* de *E. dispar* y en los casos en los que sí diferencia *E. histolytica*, la sensibilidad es menor a la obtenida en formato ELISA.

7.1.3.3 Técnicas serológicas

Las técnicas de detección de anticuerpos permiten principalmente detectar infecciones extraintestinales. Las pruebas serológicas presentan una alta sensibilidad (>94%) y especificidad (>95%) en el diagnóstico de esta patología. Existen falsos negativos si la determinación se realiza antes de los 7-10 días de iniciada la clínica.

En zonas de alta prevalencia la interpretación de la IgG es más controvertida que en zonas de baja endemicidad, ya que la detección de anticuerpos puede deberse a infecciones pasadas.

La técnica serológica más utilizada es la de ELISA, aunque también existen técnicas de hemaglutinación (HIA) e inmunofluorescencia (IFI).

7.1.3.4 Detección de ácidos nucleicos

Existen múltiples protocolos de PCR tanto convencional, como nested-PCR, como a tiempo real que permiten detectar ADN de *E. histolytica* tanto en muestras de heces como en muestras de abscesos con excelentes resultados de sensibilidad y especificidad. También se han diseñado protocolos de PCR múltiple que incluyen *E. histolytica* entre otros enteropatógenos.

Existen protocolos comerciales, pero también la posibilidad de diseñarlos adaptándose a las necesidades de cada laboratorio.

Las técnicas de PCR han sustituido a las técnicas de detección de antígeno en la diferenciación de esta especie de las no patógenas, ya que presentan hasta 10 veces mayor sensibilidad que las primeras.

Las técnicas moleculares también son utilizadas en estudios de tipado y en la caracterización de brotes.

7.2 GIARDIOSIS

7.2.1 Características generales

Giardia intestinalis (*Giardia duodenalis*, *Giardia lamblia*) es el principal protozoo flagelado causante de infección en el humano.

La forma trofozoica de *G. intestinalis* es muy característica, tiene forma de pera y mide 10-18 µm. Presenta dos núcleos en su cara anterior perfectamente visibles y se mueve mediante flagelos. La forma quística mide de 8-12 µm. Presenta de 2 a 4 núcleos y permite distinguir un orgánulo llamado axostilo que atraviesa de forma longitudinal el quiste.

7.2.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos

Es un microorganismo de transmisión fecal-oral y de distribución mundial, con mayor prevalencia en países en vías de desarrollo. En países desarrollados causa infección principalmente en la edad infantil y puede presentarse en forma de brotes incluso entre convivientes. Además de la transmisión mediante alimentos y aguas contaminados, también está descrita la transmisión de *G. intestinalis* mediante relaciones sexuales oro-anales.

Los pacientes con hipogammaglobulinemia o inmunodeficiencias como la inmunodeficiencia común variable presentan mayor predisposición a la infección por *G. intestinalis*.

Se considera que el 5-15% de los pacientes infectados son asintomáticos. La forma clínica habitual es diarrea de características de malabsorción que suele estar acompañada por dolor y distensión abdominal, flatulencia y pérdida de peso. En ocasiones esta clínica se prolonga y puede presentarse de forma intermitente, de modo que se solapa con la clínica típica del síndrome de intestino irritable con el que puede confundirse.

7.2.3 Diagnóstico de laboratorio

7.2.3.1 Examen microscópico

El diagnóstico de elección de la giardiasis se basa en la observación microscópica de los trofozoítos y/o quistes de *G. intestinalis*.

El examen directo con suero salino de las heces diarreicas permite observar los trofozoítos con el movimiento flagelar característico, rápido y generalmente en una sola dirección haciendo giros sobre sí misma. En el examen en fresco en muchas ocasiones se observan simultáneamente trofozoítos y formas quísticas.

En caso de no procesarse inmediatamente las heces deben fijarse y utilizar una técnica de concentración aumentando la posibilidad de visualizar los quistes. A pesar de ello, la microscopía presenta una sensibilidad limitada (50-85%).

En caso de alta sospecha o en pacientes con factores predisponentes la sensibilidad del estudio coproparasitológico aumenta al aumentar el número de muestras. Otra técnica que puede ser útil pero cada vez está más en desuso es la realización de un aspirado duodenal.

7.2.3.2 Pruebas rápidas de detección de antígeno

Las técnicas de detección de antígeno, tanto en formato ELISA como inmunocromatografía, poseen mayor sensibilidad para el diagnóstico de giardiasis que el examen microscópico, aunque si se compara con el examen coproparasitológico seriado esta diferencia de sensibilidad es menor.

Las técnicas de inmunocromatografía aportan la posibilidad de hacer un diagnóstico rápido en pacientes con diarrea aguda.

7.2.3.3 Detección de ácidos nucleicos

Existen múltiples protocolos de PCR tanto convencional, como nested-PCR y PCR a tiempo real que permiten detectar ADN de *G. intestinalis* en muestras de heces. Muchos de estos protocolos son múltiples e incluyen también otros protozoos o enteropatógenos en general.

Tanto las técnicas inmunológicas como las moleculares disminuyen mucho su sensibilidad en la detección de portadores asintomáticos.

Las técnicas moleculares también son utilizadas en estudio de tipado y caracterización de brotes, así como para detección de resistencias a antiparasitarios de *G. intestinalis* en pacientes que no responden al tratamiento convencional con imidazoles.

7.3 INFECCIONES POR COCCIDIOS: CRIPTOSPORIDIOSIS, CICLOSPORIDIOSIS, CYSTOSPORIDIOSIS

7.3.1 Características generales

Los coccidios intestinales son un grupo de protozoos formado por tres patógenos *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis* y *Cystoisospora belli*. Tienen como característica común que se localizan en el interior del enterocito y que poseen un ciclo biológico complejo que incluye una fase de reproducción sexuada y una asexual. Las tres especies eliminan ooquistes (formas de resistencia) con las heces.

Dentro de *Cryptosporidium* spp. existen más de 26 especies diferentes, dentro de ellas *C. hominis* (exclusivamente humana) y *C. parvum* son las más frecuentemente detectadas en humanos. *C. cayetanensis* y *C. belli* son exclusivamente humanas.

7.3.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos

Cryptosporidium spp. es un protozoo de distribución universal. Se transmite por vía fecal-oral principalmente vehiculizado por agua contaminada. La distribución de la infección es estacional, con un número aumentado de casos en los meses de verano.

C. cayetanensis presenta un patrón semejante en brotes relacionados con alimentos y aguas contaminadas pero la distribución geográfica es más restringida a países en vías de desarrollo entre los que destacan característicamente Nepal y Perú. En países industrializados su frecuencia se ha relacionado con la ingesta de alimentos provenientes de áreas endémicas.

La infección por *Cryptosporidium* spp. causa generalmente una diarrea autolimitada, principalmente en la edad infantil. En pacientes infectados por el VIH o con otras causas de inmunodeficiencias puede causar una diarrea acuosa grave, al igual que sucede con *C. belli*. En el caso de *C. cayetanensis* la forma clínica no difiere especialmente entre pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos y no se considera una infección oportunista en estos pacientes.

7.3.3 Diagnóstico de laboratorio

7.3.3.1 Examen microscópico

Los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y *C. cayetanensis* son estructuras pequeñas (4,5-5,5 μm y 9-10 μm respectivamente) difíciles de ver en el examen microscópico tanto en fresco como en la muestra concentrada.

En el caso de *C. belli* los ooquistes son mucho más grandes, con forma ovoidea y permiten observar en su interior dos ooquistes esféricos.

El examen microscópico en los tres casos aumenta su rentabilidad utilizando tinciones como la tinción de Kinoun, la tinción de Ziehl-Neelsen o la tinción fluorescente de auramina que refleja la característica ácido-alcohol resistente de los ooquistes.

7.3.3.2 Detección de antígeno

Existen comercializadas múltiples técnicas de detección de antígeno de *Cryptosporidium* spp., la mayoría de ellas en formato inmunocromatográfico en los que también se detecta el antígeno de *G. intestinalis*.

7.3.3.3 Detección de ácidos nucleicos

Existen múltiples protocolos de PCR para detección de *Cryptosporidium* spp., *C. cayetanensis* o *C. belli*. En el caso del primero existen también protocolos para el tipado y caracterización de brotes e incluso para identificación de las distintas especies.

7.4 OTROS PROTOZOOS

7.4.1 Infección por *Dientamoeba fragilis*

Dientamoeba fragilis es un protozoo de distribución mundial y que infecta especialmente al hombre. A pesar de su nombre está clasificado dentro de los protozoos flagelados y característicamente no presenta forma quística. El trofozoíto es de pequeño tamaño (5-15 μm) y presenta generalmente dos núcleos. Se elimina por las heces y a pesar de no poseer forma quística la vía de transmisión más aceptada es la fecal-oral.

La prevalencia de *D. fragilis* es muy variada oscilando entre 0,4-42%, este valor está estrechamente relacionado con la técnica diagnóstica utilizada. Durante mucho tiempo se ha dudado de la patogenicidad de este protozoo, actualmente su patogenicidad parece demostrada relacionándose con un cuadro diarreico leve que puede cronificar. Es de los pocos protozoos que pueden producir eosinofilia.

El diagnóstico es complejo, debido principalmente a la falta de forma quística. El trofozoíto es lábil y para observarse en las heces requiere de transporte o fijación inmediata de la muestra, por lo que en muchas ocasiones está infradiagnosticada.

En el examen en fresco se observa el movimiento típico mediante pseudópodos y los dos núcleos característicos.

Para aumentar la sensibilidad del examen microscópico en muestras fijadas (los medios fijadores que no contienen formaldehído también presentan problemas para fijar los trofozoitos de *D. fragilis* deben utilizarse tinciones permanentes como la hematoxilina férrica o el tricrómicro.

Las técnicas basadas en PCR han aumentado de forma importante la detección de este patógeno y reevaluando su valor patógeno.

7.4.2 Infección por *Blastocystis hominis*

Blastocystis hominis es uno de los protozoos que más frecuentemente se detecta en los estudios coproparasitológicos con prevalencias cercanas al 100% en estudios realizados en niños en países en vías de desarrollo. Es de distribución mundial y su mecanismo de transmisión es fecal-oral.

Es un protozoo complejo, se conocen hasta 16 subtipos y sólo los 9 primeros (ST 1-9) están descritos en humanos. Presenta una gran variabilidad en su tamaño (8-30 μm) y una gran vacuola central en su citoplasma con un número variable de núcleos en la periferia.

La patogenicidad de *B. hominis* es controvertida, se ha relacionado con la presencia de manifestaciones gastrointestinales como diarrea, dolor abdominal y vómitos, también se ha relacionado con la presencia de síndrome de intestino irritable o de urticaria crónica. Por el contrario, otros autores consideran que no produce manifestaciones clínicas.

La detección de *B. hominis* se realiza mediante examen microscópico de las heces principalmente tras concentración de la muestra.

Existen técnicas de PCR que permiten identificar este protozoo, así como realizar estudios de tipado intentando relacionar los diferentes subtipos con la presencia de manifestaciones clínicas.

8. HELMINTOS: NEMATODOS

8.1 ESTRONGILOIDIASIS

8.1.1 Características generales

La estrongiloidosis está causada principalmente por *Strongyloides stercoralis*, aunque se han descrito, de forma mucho menos frecuente, infecciones por *S. fuelleborni fuelleborni* y *S. fuelleborni kellyi*. Esta geohelmin-tosis se incluye en el grupo de enfermedades tropicales desatendidas de la OMS. Presenta un ciclo biológico único, ya que tiene dos formas de transmisión: i) la heteroinfección, cuando el mecanismo de transmisión se produce mediante la penetración transcutánea de larvas filariformes o mediante ingestión de larvas filariformes (mucho más raro). Estas larvas atraviesan el tejido celular subcutáneo accediendo a la circulación sanguínea, llegan a cavidades derechas del corazón y pasan al pulmón para ascender por el árbol bronquial hasta llegar a la tráquea, la laringe y la faringe, donde son deglutidas. Tras llegar al intestino delgado alcanzan su madurez sexual. En el intestino, las hembras se reproducen por partenogénesis, ponen los huevos, eclosionan y posteriormente se liberan las larvas rhabditiformes. En el suelo, las larvas rhabditiformes, o bien se transforman directamente en larvas filariformes (preparadas para penetrar en un nuevo hospedador), o se transforman en adultos de vida libre, con posterior cópula y desarrollo del ciclo biológico para introducirse posteriormente en un nuevo hospedador. ii) La autoinfección es una característica biológica exclusiva de la infección por estrongiloidosis. Es la posibilidad de transformación de larvas rhabditiformes a larvas filariformes en el intestino grueso del hospedador. Así, las larvas filariformes no tienen que salir al medio externo y pueden volver a penetrar a través de la mucosa intestinal y/o de la piel perianal, produciendo autoinfección. Debido a la autoinfección se produce una reactivación del ciclo que puede dar lugar a una persistencia de la infección u originar un cuadro de hiperinfección con consecuencias mortales. En este proceso pueden influir factores sistémicos como la administración de glucocorticoides o la co-infección por HTLV-1 o alteraciones locales como el estreñimiento, diverticulosis, etc.

8.1.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos

La clínica de esta enfermedad es muy variable y está influida por el grado de inmunodepresión que presentan los pacientes. Así, en la mayoría de ocasiones es una infección indolente y alrededor de la mitad de los pacientes inmunocompetentes están asintomáticos durante décadas. Cuando existen manifestaciones clínicas predominan las de la esfera digestiva (dolor epigástrico, diarrea intermitente o pérdida de peso), las manifestaciones cutáneas (larva currens, exantema urticariforme inespecífico) y/o la eosinofilia, que en ocasiones se asocia con clínica respiratoria debida al paso larvario.

Los pacientes inmunodeprimidos pueden presentar cuadros muy graves de estrongiloidosis diseminada con una alta mortalidad (mayor del 60%) a pesar de un tratamiento correcto, característicamente es el llamado síndrome de hiperinfección. Suele afectar múltiples sistemas y/o órganos (respiratorio, digestivo, nervioso central, renal, cutáneo, etc). En estos casos el paciente suele presentar cifras normales de eosinófilos en sangre periférica, y presenta un riesgo aumentado de translocación bacteriana (generalmente por bacterias gramnegativas), incrementándose el riesgo de sepsis y fracaso multiorgánico.

La distribución de la estrongiloidosis es cosmopolita, fundamentalmente en áreas tropicales y subtropicales de todos los continentes del planeta. Hay gran disparidad entre las cifras de prevalencia global aportadas, que varían entre 30 y 370 millones. En Europa es endémica en algunas regiones como Rumanía e Italia.

En España, su importancia epidemiológica ha disminuido drásticamente debido a diferentes factores como al crecimiento económico, el abandono de las técnicas agrícolas tradicionales, la mecanización de la agricultura, y la mejora en las redes de saneamiento en las zonas rurales, siendo en la actualidad excepcionales los casos autóctonos.

8.1.3 Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de estrongiloidosis no está estandarizado, alcanzándose el diagnóstico de certeza solo cuando se identifican las larvas de *S. stercoralis*; un alto índice de sospecha es clave para realizar un diagnóstico correcto. Los métodos utilizados para el diagnóstico etiológico de la estrongiloidosis son de dos tipos: directos (parasitológicos y moleculares) e indirectos (inmunológicos).

8.1.3.1 Examen microscópico y cultivo

El diagnóstico definitivo se establece al detectar larvas de *S. stercoralis* en heces y/o fluido duodenal, que, salvo en infección aguda o en casos de hiperinfestación, se suelen eliminar en escasa cantidad y esporádicamente. Por ello, la sensibilidad de los métodos habituales de concentración es muy baja, sobre todo si se realiza un único examen. En pacientes con hiperinfestación también se puede aislar en el lavado broncoalveolar y líquido pleural. Las técnicas más utilizadas son las de concentración en formalina-éter y las de migración larvaria en medio líquido (técnica de Baermann, técnica de Harada-Mori) o sólido (cultivo en placas de agar enriquecido).

8.1.3.2 Técnicas serológicas

Las pruebas serológicas presentan mayor sensibilidad que el estudio directo en heces y en general tienen un alto valor predictivo negativo, y son útiles para la exclusión de una infección por *S. stercoralis*. Además, la combinación de pruebas serológicas puede ayudar a aumentar su especificidad. Estas técnicas incluyen enzimoinmunoensayo (ELISA), inmunofluorescencia indirecta, técnicas de aglutinación e inmunotransferencia.

El ELISA dirigido contra inmunoglobulinas específicas de tipo IgG es la técnica serológica que cuenta con los mejores resultados de sensibilidad y especificidad (aunque la sensibilidad puede disminuir en pacientes inmunodeprimidos). Las IgG pueden detectarse a partir de las 2 semanas posinfección, mientras que la IgM puede detectarse desde la primera semana y permanecer detectable hasta la tercera. Esta técnica se ha estudiado con diferentes muestras biológicas (suero, líquido cefalorraquídeo, saliva, heces, etc.) con buenos resultados. Así, en un estudio de infección crónica por *S. stercoralis* con dos ELISA comerciales, se demostró una sensibilidad del 89 y 83%, y una especificidad del 97%. Como mayores desventajas citamos: i) la reactividad cruzada con otros nematodos, ii) la falta de estandarización entre centros, iii) una sensibilidad disminuida en pacientes con neoplasias hematológicas o infecciones por virus linfotrópico humano tipo I, iv) no permite distinguir entre infección activa o previa (dada la capacidad de las IgG de mantenerse elevadas en el tiempo, sobre todo en zonas endémicas). Sin embargo, en áreas con prevalencias más bajas, la detección de anticuerpos puede utilizarse como método de cribado poblacional. Se han desarrollado igualmente inmunoblots con proteínas inmunodominantes de larvas filariformes (como técnicas de confirmación), pruebas RAST (*Radio Allergo Sorbent Test*) con absorbentes específicos para la inmunoglobulina o técnicas de inmunofluorescencia indirecta con larvas muertas, generalmente de otras especies zoonóticas de *Strongyloides*. A pesar de presentar valores elevados de sensibilidad y especificidad, no son raras las reacciones cruzadas con otros nematodos, por lo que esta técnica se reserva como auxiliar. Además, recientemente se ha descrito una nueva técnica basada en la inmunoprecipitación de luciferasa (LIPS), para la detección de IgG frente a dos antígenos, uno recombinante denominado nIE y otro inmunorreactivo llamado Sslr, con buenos resultados de sensibilidad y con una especificidad del 100%. Si se demuestra rentable y fácil de aplicar, podría ser una buena técnica de cribado que sustituya a la técnica de ELISA. Las pruebas de detección de antígenos permiten solventar los problemas mencionados derivados de la detección de anticuerpos. Se han desarrollado diferentes ELISAs de captura para la detección de coproantígenos de *Strongyloides* spp. mediante antígenos policlonales del parásito y, aunque los resultados son prometedores, todavía son preliminares.

8.1.3.3 Detección de ácidos nucleicos

A pesar de que recientemente se ha desarrollado una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real para detectar *Strongyloides* spp. en muestras fecales, su uso está todavía limitado a unos pocos laboratorios de referencia. Como mayores limitaciones en la utilización de PCR cabe señalar que: i) la eliminación intermitente y escasa de larvas dificulta su detección, sobre todo en enfermos con una carga parasitaria baja, ii) la pequeña cantidad de muestra analizada también influye en la baja sensibilidad de estas técnicas, produciendo una cifra elevada de falsos negativos, iii) actualmente se dispone de pocos *kits* comerciales y la extracción de ADN no es tarea sencilla, y iv) los protocolos utilizados no están bien estandarizados (las mayores diferencias atañen a la extracción de ADN, el tamaño, la conservación de las muestras fecales y las soluciones para neutralizar los posibles inhibidores de la PCR) dado que las muestras fecales contienen mucha materia que podrían actuar como inhibidores de la amplificación de ADN, por lo que es importante incluir en la técnica controles de amplificación. Se han diseñado PCRs a tiempo real con diferentes dianas. No obstante, los resultados de sensibilidad no son mejores que los obtenidos con los métodos de Baermann o el cultivo en placa de agar. Se están desarrollando también PCRs múltiples para parásitos intestinales con buenos resultados preliminares. Por todo lo comentado parece que las técnicas de PCR no son especialmente útiles en el cribado ni como única prueba para el diagnóstico. Sin embargo, dada su elevada especificidad, serían una buena opción como prueba confirmatoria.

Por último, recientemente se están desarrollando técnicas moleculares tipo LAMP, para su uso en diferentes muestras (heces, orina, etc), que presentan como ventajas una elevada especificidad, sensibilidad y potencialidad de ser aplicada en campo. Se trata de una amplificación de ADN en condiciones isotérmicas que permite una identificación visual del resultado sin necesidad de equipos especializados, lo que disminuye considerablemente el coste y permite su fácil aplicación, aunque los resultados todavía no han sido validados y están pendientes de confirmación.

8.2 GNATHOSTOSOMIASIS

8.2.1 Características generales

La gnatostomiasis es una zoonosis producida por nematodos del género *Gnathostoma*. En la actualidad se han descrito 5 patógenos humanos: *G. spinigerum*, *G. doloresi*, *G. binucleatum*, *G. hispidum* y *G. nipponicum*, siendo *G. spinigerum* y *G. hispidum* las especies más importantes. Tienen un ciclo de vida muy complejo que requiere de tres huéspedes: i) un copépodo (crustáceo) de agua dulce que ingiere los huevos que los adultos eliminan; ii) una amplia gama de peces y otros hospedadores intermedios acuáticos para la maduración larvaria; y iii) hospedadores vertebrados definitivos para el desarrollo de adultos. Estos nematodos tienen diferentes fases: huevo, larva (L1, L2, L3, L4) y adulto. Cada fase larvaria se localiza en un hospedador determinado o en el medio ambiente. La forma infectiva para hospedadores intermediarios, paraténicos y humanos es la larva L3. Los humanos la adquieren habitualmente tras la ingesta de carne cruda o poco cocinada de peces de agua dulce, anfibios, aves de corral o roedores infectados con larvas L3. En el hombre estos nematodos nunca alcanzan su estado adulto, salvo rara excepción.

8.2.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos

Las manifestaciones clínicas se pueden dividir en: i) fase aguda, ii) manifestaciones crónicas cutáneas y iii) viscerales. Sin tratamiento las manifestaciones clínicas de gnatostomiasis se pueden mantener durante 12 años de forma intermitente.

La fase aguda se produce a las 24 a 48 horas de la ingesta del *Gnathostoma* spp. El paciente desarrolla signos y síntomas inespecíficos como malestar general, fiebre, urticaria, anorexia, náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal. Estos síntomas se producen cuando la larva migra a través del estómago, intestino, o hígado y puede durar 2 a 3 semanas. En esta fase generalmente presentan una eosinofilia marcada.

La clínica cutánea se produce cuando la larva migra a través del tejido subcutáneo a la piel. Es la manifestación más frecuente. Se produce a las 3 a 4 semanas de la ingestión, aunque el inicio de los síntomas se puede retrasar durante meses o años. Habitualmente se debe a solo una larva, aunque puede haber más. Se presenta típicamente con lesiones intermitentes migratorias (paniculitis migratoria nodular), generalmente afectando el tronco o las extremidades superiores. Estas lesiones edematosas varían en tamaño y pueden ser pruriginosas, dolorosas o eritematosas. En ocasiones se presenta en forma de larva *migrans*, con hemorragias subcutáneas a lo largo de los surcos, que, junto a un cuadro clínico compatible, son patognomónicas de gnatostomiasis y pueden ayudar a diferenciarla de otras causas de larva *migrans*. Los episodios se suelen volver menos intensos y de menor duración a lo largo del tiempo. Otras manifestaciones cutáneas menos comunes incluyen erupciones progresivas, nódulos cutáneos o emisión espontánea de la larva. Si las lesiones están a nivel facial existe un riesgo de invasión a nivel ocular o del sistema nervioso central. A medida que comienza la fase cutánea, la eosinofilia y los síntomas sistémicos suelen disminuir.

La gnatostomiasis visceral se produce cuando la larva penetra en los distintos órganos y tejidos profundos. Según la viscera afectada se producen diferentes síntomas. El *Gnatostoma* spp. es muy móvil y altamente invasivo. Así, las manifestaciones pulmonares incluyen tos, dolor, hemoptisis, consolidación, atelectasia, derrame pleural (eosinofílico) y neumo o hidroneumotórax. La tríada de eosinofilia, lesiones subcutáneas y derrame pleural eosinofílico inexplicable con antecedentes de exposición deben alertar sobre este diagnóstico. Las manifestaciones gastrointestinales son menos comunes, puede ser un hallazgo de forma incidental por una cirugía por otro motivo, o presentarse como un dolor abdominal o una masa, e incluso puede simular una apendicitis aguda u obstrucción intestinal. Otros síntomas atribuidos incluyen hematuria, sangrado vaginal profuso, cervicitis, balanitis, masa anexial, hematospermia. A nivel otorrinolaringológico puede producir mastoiditis, pérdida de audición y extrusión de la larva a través del canal auditivo externo, paladar blando, mejilla, punta de lengua y membrana timpánica. La afectación ocular puede provocar síntomas de uveítis (generalmente anterior), iritis, hemorragia intraocular, glaucoma y desprendimiento retiniano. La larva generalmente se encuentra en la cámara anterior y puede recuperarse intacta. La afectación a nivel del sistema nervioso central es la que tiene mayor mortalidad (25%) y secuelas (30%). Los principales cuadros de afectación del sistema nervioso central son una radiculomielitis, radiculomieloencefalitis, meningitis eosinofílica y hemorragia subaracnoidea. Los síntomas característicos son dolor radicular, cefalea, paresia del nervio craneal y/o las extremidades. La retención urinaria es habitual en la radiculomielitis y radiculomieloencefalitis. La afectación cerebral no suele producir síndrome confusional. La muerte se desencadena por invasión estructuras del tronco encefálico o de una arteria cerebral (que produce una hemorragia subaracnoidea masiva).

Esta zoonosis está extendida sobre todo en Japón y el sudeste asiático, particularmente en Tailandia. Asimismo, esta descrita en Camboya, Laos, Myanmar, Indonesia, Filipinas, Malasia, China, Sri Lanka e India. En Latinoamérica se ha convertido en un problema recientemente, sobre todo en México, Guatemala, Perú, Ecuador y excepcionalmente en Colombia. Hay informes de casos en Zambia y Botswana. En España se ha descrito muy ocasionalmente en Granada. La principal causa de la expansión geográfica de la gnatostomiasis son los cambios en los hábitos alimenticios.

8.2.3 Diagnóstico de laboratorio

En la práctica clínica habitual la tríada de eosinofilia, lesiones migratorias y una exposición sugestiva, orienta a un diagnóstico de gnatostomiasis. El diagnóstico de certeza se realiza mediante la visualización del nematodo en los tejidos. Sin embargo, resulta muy difícil debido a su movilidad. Es posible encontrar datos histopatológicos característicos de edema dérmico e hipodérmico, infiltrados densos mixtos, eosinófilos mezclados con linfocitos y neutrófilos, vasculitis eosinofílica, figuras en llamarada, áreas de necrosis y hemorragia que sugieren una paniculitis eosinofílica que junto al surco migratorio del parásito y al cuadro clínico permiten hacer el diagnóstico. En sangre periférica es frecuente la presencia de eosinofilia, aunque su ausencia no debe excluir el diagnóstico. En los casos de afectación a nivel del sistema nervioso central es habitual en el líquido cefalorraquídeo la presencia de una pleocitosis con predominio de eosinófilos y aumento de las proteínas, con una glucorraquia normal o disminuida. En los casos de radiculitis el líquido cefalorraquídeo puede ser normal.

Las técnicas serológicas (con una tasa de reacciones cruzadas significativas) y técnicas moleculares son de gran ayuda en el diagnóstico, pero la escasa disponibilidad es su limitación más importante. En general, las características morfológicas de larvas L3, que parasitan al hombre, se han utilizado para la identificación de las especies de *Gnathostoma*. Las larvas L3 son gusanos de cuerpo cilíndrico y extremos redondeados de 3 a 4,7 mm de longitud. En la porción anterior, presentan un bulbo cefálico en el que sobresalen tres o cuatro hileras transversales de ganchos y en la parte frontal de esta misma estructura, aparece una cavidad de forma oblonga rodeada por dos labios voluminosos que muestran un par de papilas cada uno. Al igual que los parásitos adultos, en el interior del bulbo cefálico se encuentran cuatro cámaras huecas, llamadas bayonetas, que se comunican de manera independiente con cuatro sacos cervicales en forma de maza o clava, que cuelgan libremente en el pseudoceloma y contiene un material líquido. La superficie de las larvas, al igual que en los adultos, presenta hileras de espinas cuticulares que se hacen más escasas a medida que se alejan del bulbo cefálico. Por tanto, el número de coronas y ganchos, su tamaño, su forma y las espinas cuticulares sirven como criterios morfológicos para la identificación de las especies ya que varían en distribución, forma y tamaño. Sin embargo, es muy difícil diferenciar entre especies porque estas características son muy similares y es preciso tener mucha experiencia para un correcto diagnóstico morfológico de especie.

8.2.3.1 Técnicas serológicas

Las primeras serologías que utilizaban extracto somático crudo de gusanos adultos de *G. doloresi* presentaban como inconveniente una reactividad cruzada con una gran cantidad de parásitos. Los resultados mejoraron al usarse el antígeno de *G. spinigerum* y sobre todo mediante el uso de antígeno de larvas L3 de *G. spinigerum* en lugar del gusano adulto, aunque la reactividad cruzada seguía siendo alta. Además, se han valorado técnicas de ELISA en larvas L3 con subclases de IgG. Así, los estudios con IgG2 tenían menos reactividad cruzada, con una especificidad del 88% y valor predictivo positivo del 93%, mientras que con IgG1 tienen mayor sensibilidad (98%) y valor predictivo negativo (94%). De esta manera, se podría usar el anticuerpo IgG1 como prueba de detección y el anticuerpo IgG2 para confirmar el diagnóstico. En la actualidad hay varias pruebas serológicas disponibles. El diagnóstico se puede realizar mediante la determinación de anticuerpos frente a *G. spinigerum* con una técnica de enzoinmunoanálisis, empleando antígenos crudos o mediante Western-blot. También se han usado técnicas de inmunotransferencia para detectar una banda específica de 24 kDa. Los estudios serológicos se realizan en algunos centros de Europa (Reino Unido y Suiza) y en Tailandia. Sin embargo, actualmente no hay reactivos comerciales disponibles. La serología para el diagnóstico de la gnatostomiasis a nivel del sistema nervioso central no está validada y desconocemos su utilidad en este contexto, por lo que el diagnóstico clínico y las características del LCR, que muestran una pleocitosis con predominio de eosinófilos, con un aumento de las proteínas, y una glucorraquia normal o disminuida, y de imagen ofrecerían el diagnóstico. Asimismo, la resonancia magnética ha demostrado lesiones migratorias dentro de la médula espinal.

8.2.3.2 Detección de ácidos nucleicos

Los estudios moleculares en gnatostomiasis son escasos, sin que se disponga de una PCR comercial. En estudios de comparación de secuencias de ADN ribosómico y secuencias de cox-1 de ADN mitocondrial entre diferentes especies de *Gnathostoma*. (*G. spinigerum*, *G. hispidum*, *G. doloresi*, *G. nipponicum* y *G. binucleatum*) se observaron diferencias en la cantidad de nucleótidos en la región ITS1 entre las cinco especies. En estudios realizados en Méjico parece que el análisis de la región de nucleótidos de la secuencia ITS2 sirve para la identificación para las diferentes especies de *Gnathostoma*. Las pruebas moleculares de secuenciación de ADN pueden servir como herramienta para identificación de especie, ya que no es infrecuente una identificación errónea basada en las características morfológicas, y, además, pueden ser de ayuda en estudios epidemiológicos.

8.3 OTROS NEMATODOS (*Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, uncinarias)

8.3.1 Características generales

Aproximadamente, el 25% de la población mundial está infectada por alguno de estos nematodos: *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides* y uncinarias (*Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale*). El nombre de

geohelminto, etimológicamente, deriva de la necesidad de estos vermes de realizar la maduración en tierra. Por lo tanto, su definición sería la de aquellos nematodos cuyas formas infectantes se encuentran en el suelo e infectan al ser humano vía oral o a través de la piel. Este término englobaría a las diferentes especies de gusanos que producen infecciones en el hombre, bien por ingestión de huevos eliminados a través de las heces de las personas infectadas o bien por larvas que maduran hasta transformarse y penetrar por vía transcutánea. De esta manera las condiciones de la tierra, de humedad, de temperatura y nutricionales son esenciales para el desarrollo de estos nematodos.

Estas geohelmintosis presentan ciclos biológicos similares, aunque no idénticos. Todos los parásitos tienen fases adultas con morfología cilíndrica, sin segmentación corporal con una capa externa denominada cutícula, una capa muscular y una cavidad celómica o pseudocele. Entre la cutícula y la capa muscular se encuentra la hipodermis. Además, hay una lámina basal que separa la hipodermis del pseudocele. La cavidad celómica incluye el tubo digestivo, sistema excretor nervioso y reproductor con sexos separados. Las hembras producen huevos que eclosionan dentro del hospedador o en el medio ambiente, de los cuales emerge una larva que pasa por cuatro fases hasta llegar a la fase de adulto.

La mayor carga parasitaria en áreas endémicas depende de diferentes factores genéticos e inmunológicos. Así, las infecciones presentan distintos perfiles según la edad. La población pediátrica es la más afectada por los géneros *Ascaris* y *Trichuris*, con un pico máximo de infección a los 7 años. Sin embargo, las uncinariosis presentan una curva ascendente de infección hasta los 25 años, y a partir de esa edad se estabiliza su frecuencia.

8.3.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos

La infección por alguno de estos nematodos produce habitualmente dos tipos de cuadros clínicos. Lo más frecuente es la detección de huevos en un estudio coproparasitario en pacientes asintomáticos. Cuando los enfermos tienen manifestaciones, suelen ser inespecíficas de la esfera digestiva (en muchas ocasiones difíciles de diagnosticar). Cada parasitosis puede presentar manifestaciones particulares. Así, la trichurosis se caracteriza por dolor abdominal, colitis hemorrágica, diarrea, anemia ferropénica y retraso estatura-ponderal. Puede producir un prolapso rectal, en el que se observan los vermes adultos. La ascariosis se puede manifestar como, i) síndrome de Löffler, con hipersensibilidad, fiebre, tos no productiva, disnea, eosinofilia e infiltrados pulmonares transitorios. ii) emisión de gusanos, estos pueden aparecer por la boca o por las heces. Y, por último, iii) presentan manifestaciones obstructivas; de esta manera, en áreas endémicas hasta el 85% de las obstrucciones intestinales en niños entre 1-5 años se deben a esta helmintosis. Además, pueden producir cuadros de pancreatitis, colangitis, colecistitis y abscesos hepáticos. La uncinariosis puede presentar los siguientes cuadros: i) anemia ferropénica y la malnutrición (manifestaciones más importantes), ii) lesiones cutáneas, mientras que *A. caninum* y *A. braziliensis* producen larva cutánea migrans, *N. americanus* y *A. duodenale* suelen presentar lesiones sistémicas, iii) pseudo-Löffler, produciendo una neumonitis transitoria, similar a la causada por *Ascaris* spp. aunque más leve y, iv) cuando la ruta de infección es por vía oral se puede producir un cuadro de náuseas, vómitos, irritación faríngea, tos, disnea y ronquera llamado síndrome de Wakana que se produce por la migración de las larvas filariformes.

La alteración analítica más frecuente y significativa de estas geohelmintosis es la eosinofilia, aunque según el cuadro específico se puede acompañar de anemia, fundamentalmente ferropénica, alteraciones en el perfil hepático, así como datos de malnutrición.

Más de 1.500 millones de personas están infectadas por uno de estos cuatro nematodos, lo que constituye un problema de salud pública en todo el mundo. Con frecuencia se observan coinfecciones, ya que estos patógenos se desarrollan en condiciones similares. Presentan características epidemiológicas comunes, aunque con diferencias significativas. En general, son enfermedades que afectan a personas pobres de países desfavorecidos. La distribución geográfica es mundial, y algunos presentan una tendencia a una distribución cosmopolita. Tienen una mayor prevalencia en áreas tropicales y subtropicales de África subsahariana, Centro y Sudamérica, China y Asia Oriental. La más prevalente es la ascariosis (se estima que una cuarta parte de la población mundial está infectada con *A. lumbricoides*), seguida de las uncinariosis (más prevalentes las infecciones producidas por *N. americanus* que las de *A. duodenale*) y finalmente la trichurosis con una estimación

de 800 millones de personas infectadas. En las comunidades donde la trichurosis es endémica, la infección puede estar presente en más del 90% de la población.

8.3.3 Diagnóstico de laboratorio

Las técnicas serológicas disponibles se reservan para estudios epidemiológicos, dado que presentan importantes limitaciones para su uso clínico. Por eso, la herramienta más utilizada continúa siendo el análisis microscópico de las heces y, en muchas ocasiones, debido a que estos nematodos son morfológicamente similares, el diagnóstico diferencial continúa siendo un reto. Además, debido a la baja sensibilidad de la microscopía, esta no es la herramienta ideal para detectarlos. Habitualmente se utilizan las técnicas de Kato Katz, FLOTAC o Ritchie (sedimentación en la que se emplea formol, alcohol tamponado y éter etílico). Parece que la técnica de Kato Katz es más sensible para el diagnóstico de ascariosis y trichurosis, mientras que la de Ritchie es mejor para el diagnóstico de uncinarias, aunque hay divergencias según los estudios. Por último, parece que el análisis coprológico de tres muestras aumenta la rentabilidad diagnóstica frente al análisis de una o dos muestras fecales.

8.3.3.1 Examen macroscópico y microscópico

El diagnóstico de trichuriasis se realiza mediante el examen de heces para la detección de huevos, que no son infectantes cuando se excretan. Son ovales, de color marrón amarillento y tienen característicamente forma de barril con una pared gruesa y lisa, y dos tapones polares a cada extremo. La mayoría de los huevos de *T. trichiura* tienen un tamaño de 50-56 μm por 21-26 μm , aunque un porcentaje muy pequeño de los huevos pueden alcanzar 78 μm por 30 μm . A pesar de que estos huevos grandes se asemejan a *T. vulpis*, pueden diferenciarse por su morfología. Los huevos de *T. suis* son muy similares a *T. trichiura*. La técnica de detección preferida es la de Kato-Katz, que se usa para cuantificar el número de huevos, el cual suele correlacionarse con la carga de vermes adultos. La colonoscopia o rectoscopia muestran frecuentemente gusanos adultos. El gusano adulto de *T. trichiura* es de color blanquecino. La hembra mide entre 35-50 mm de longitud y el macho entre 30-45 mm. Una característica morfológica importante es que su tercio anterior es mucho más delgado que los dos tercios posteriores, por lo que se le llama también gusano látigo. En el extremo anterior se localiza el orificio bucal, carente de labios. El esófago es musculoso y delgado en la parte anterior, y la parte final presenta una capa de células secretoras que reciben el nombre de esticocitos; el cordón que forman se conoce como esticosoma, y su importancia radica en que permite diferenciarlo de otros nematodos. Los casos de *larva migrans* son muy poco frecuentes, y su diagnóstico es clínico.

Para el diagnóstico de ascariosis se observan los huevos característicos en el examen directo de las heces o las técnicas de concentración como el FLOTAC, considerada la técnica más sensible, pero requiere una centrifuga, y el Kato-Kat (método recomendado por la OMS), debido a su simplicidad, bajo coste y capacidad para facilitar la detección de múltiples especies de parásitos. Sin embargo, la sensibilidad del Kato-Katz es baja en infecciones de baja intensidad. En entornos con alta prevalencia de ascariasis la sensibilidad de Kato-Katz y FLOTAC son comparables. Los huevos no aparecen en las heces hasta al menos 40 días después de la infección; por lo tanto, no se puede hacer un diagnóstico temprano, ni durante la fase de respiratoria. Además, no habrá huevos en las heces si la infección se debe solo a gusanos machos. Los gusanos adultos de *A. lumbricoides* maduran hasta alcanzar 35 cm de largo (hembras de 20 a 35 cm; machos de 15 a 30 cm) y 6 mm de diámetro. Los gusanos son blancos o rosados y están afilados en ambos extremos. Los huevos de *A. lumbricoides* y *A. suum* son indistinguibles.

El diagnóstico definitivo de uncinariosis se establece por la visualización de huevos, que se pueden detectar aproximadamente ocho semanas después de la penetración dérmica. En la fase de migración tisular de las larvas, raramente se establece el diagnóstico por visualización de larvas en esputo o aspirados gástricos. Para una correcta identificación del parásito, se debe tener en cuenta tanto la morfología de los huevos como la de las larvas estudiadas. En el caso de *A. duodenale* los huevos son ovales con cubierta fina con un tamaño entre 60-40 μm y los de *Necator* spp. son parecidos, aunque suelen ser un poco más largos, con un tamaño que oscila entre 70-40 μm , y es frecuente que haya dificultades para su correcta identificación. Respecto al diagnóstico de las larvas de uncinarias, las de primer estadio (L1) miden entre 250-350 μm , poseen un canal

bucal largo, esófago rabditoide y primordio genital no aparente. Las larvas de tercer estadio (L3), tienen un tamaño entre 500-700 µm, esófago filariforme corto (1/3 de la longitud corporal) y extremo caudal fino. Las larvas de *A. duodenale* poseen una cutícula lisa, mientras que las de *N. americanus* son estriadas, lo que permite diferenciar ambas especies. En el caso de cuadros de larva migrans el diagnóstico es clínico.

8.3.3.2 Detección de ácidos nucleicos

Las técnicas de diagnóstico molecular mediante PCR están demostrando buenos resultados de sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de estas geohelminosis, en comparación con la microscopía clásica, aunque los resultados varían según la técnica molecular empleada. Como ventaja de las pruebas moleculares hay que mencionar su capacidad para detectar infecciones de baja intensidad. Las técnicas más esperanzadoras serían la PCR cuantitativa en tiempo real, que, a diferencia de la PCR convencional, permite la cuantificación de la infección y la PCR multiplex. Se están desarrollando varias técnicas de PCR multiplex con resultados prometedores para el diagnóstico de *A. lumbricoides*, *T. trichiura* y *N. americanus*, con sensibilidades y especificidades de 87 y 83%, respectivamente. En otro estudio la sensibilidad de PCR cuantitativa para detectar *T. trichiura* fue del 72%. Los mayores inconvenientes de estas técnicas son su elevado coste y la tecnificación necesaria lo que dificulta su disponibilidad para su uso rutinario.

8.4 OXIURIASIS

8.4.1 Características generales

Enterobius vermicularis es un nematodo intestinal, responsable de la enterobiasis u oxiuriasis. Tiene un ciclo de vida simple, siendo el hombre el principal reservorio. Se transmite habitualmente por la ingestión de alimentos, agua, contacto con objetos o manos contaminadas con huevos del parásito.

8.4.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos

La mayoría de pacientes con oxiuriasis están asintomáticos. Esta enfermedad se sospechará en aquellos sujetos (fundamentalmente niños), que presenten prurito anal, sobre todo nocturno. El prurito se produce no solo por la acción mecánica del verme, sino también por la reacción de hipersensibilidad local producida por las secreciones uterinas de la hembra en el margen perianal, estimulada por el calor, más intenso en horas nocturnas y tras la defecación. La intensidad del prurito produce ocasionalmente cuadros de insomnio. El rascado conduce al alojamiento de los huevos debajo de las uñas, facilitando la autoinfección posterior y/o la transmisión de persona a persona y está descrita la infestación de la mucosa nasal. Si la excoiación es grave se pueden producir sobreinfecciones bacterianas. Esta nematodosis puede asociarse a otros síntomas como irritabilidad, anorexia y bruxismo. En casos con una alta carga parasitaria se pueden desarrollar cuadros de dolor abdominal, náuseas y vómitos. Ocasionalmente *E. vermicularis* migra a localizaciones extraintestinales. Así, está descrita una amplia gama de presentaciones clínicas ginecológicas con vulvovaginitis, como consecuencia de la migración de larvas hacia el tracto genital femenino, además de cuadros de salpingitis, ooforitis, granuloma cervical e incluso inflamación peritoneal. Estos cuadros pueden aumentar de forma secundaria las cifras de infecciones urinarias. *E. vermicularis* se ha encontrado en muestras histológicas de apéndices intervenidos, estando en debate si puede causar o no apendicitis. Además, se ha descrito a este parásito como agente etiológico de enterocolitis eosinofílica, aunque los pacientes con oxiuriasis no suelen presentar eosinofilia periférica.

La distribución de la oxiuriasis es cosmopolita, es uno de los nematodos más frecuentes en el mundo y está distribuida desde el ártico hasta los trópicos. Afecta a todos los grupos de edad, aunque es más frecuente en escolares de 5 a 10 años de edad (y menos frecuente en menores de 2 años). Así, se estima que entre el 20 y 30% de la población infantil del mundo presenta oxiuriasis. Además, afecta a todos los grupos socioeconómicos, encontrando mayor transmisión cuando las personas viven en condiciones de hacinamiento, o en convivencias grupales (familia, escuelas y asilos). Es seguramente una de las helmintiasis más frecuentes en Estados Unidos, Europa Occidental y España. Sin embargo, la información disponible en España acerca de la oxiuriasis es escasa y fragmentada y, la mayoría de los trabajos describen casos aislados, o pequeñas series centradas en determinados grupos etarios (series pediátricas).

8.4.3 Diagnóstico de laboratorio

La sospecha clínica es fundamental dada la sintomatología tan inespecífica que suelen presentar los pacientes con oxiuriasis. El diagnóstico implica la demostración de los huevos o los gusanos adultos en el margen perianal usando el test de Graham. En 1941, Graham introdujo la cinta adhesiva como método diagnóstico y aunque ha sufrido algunas modificaciones, sigue siendo el método más sensible y específico para el diagnóstico de *E. vermicularis*. Los métodos parasitológicos coproscópicos convencionales utilizados para otras helmintiasis intestinales, como el Kato-Katz, resultan poco sensibles para la detección de huevos, con una tasa de positividad entre 1-5%.

Se aconsejará realizar la toma por la mañana, antes del lavado de la zona perianal (la noche anterior se puede hacer un aseo normal), ya que las hembras adultas de *E. vermicularis* efectúan la puesta de huevos en la madrugada, momento en que el huésped presenta mayor cantidad de los mismos. Para realizar el diagnóstico se hace uso de un trozo de cinta adhesiva transparente de 3 cm de largo por 1 de ancho, aproximadamente. A continuación, se separan los glúteos y se presiona por la zona adherente contra los márgenes del ano impregnándola lo mejor que sea posible. Después se pega la cinta adhesiva sobre un portaobjetos de cristal procurando extenderla a lo largo. Éste se introduce en un frasco estéril o en un sobre que se rotula y se conserva en la nevera. Para aumentar la sensibilidad es recomendable realizar esta prueba de forma seriada debido a la irregularidad de las migraciones del parásito, así se recogerán 3 muestras en 3 días diferentes utilizando un porta de cristal distinto para cada día. Es muy importante que la persona que recoge la muestra se lave las manos con abundante agua y jabón para evitar el contagio.

8.4.3.1 Examen microscópico

Habitualmente los huevos de *E. vermicularis* no suelen ser visibles en heces, orina o exudado vaginal, siendo la técnica más eficaz para su visualización el test de Graham. Los huevos miden aproximadamente 50-54 × 20-27 μm, son blancos, transparentes, y tienen una forma característica, aplanada por un lado (similar a la letra "D"), tienen membrana doble que contiene un embrión completamente formado.

Ocasionalmente se puede observar de forma directa las formas adultas (habitualmente las hembras) en la región perineal o en las heces del paciente. Estos nematodos son de color blanco nacarado, la hembra adulta tiene la capacidad de producir varios miles de huevos cada día, mide aproximadamente 8-13 mm y 0,5 mm de ancho, y tiene una cola larga y puntiaguda con una vulva en forma de hendidura. El macho es mucho más pequeño (2,5 mm de largo y 0,2 mm de ancho) con forma curva y un extremo caudal romo.

8.4.3.2 Técnicas serológicas y detección de ácidos nucleicos

En esta parasitosis están poco desarrolladas las técnicas serológicas y las de detección de ácidos nucleicos. No está disponible ninguna herramienta comercial de diagnóstico serológico mientras que algunos paneles de diagnóstico sindrómico molecular de enteropatógenos empiezan a incluir este patógeno. Las técnicas de PCR que analizan el gen *cox1* y la región ITS2 del helminto han mostrado buenos resultados de sensibilidad y especificidad.

9. HELMINTOS: TREMATODOS

9.1 ESQUISTOSOMIASIS

9.1.1 Características generales

La esquistosomiasis es una enfermedad crónica parasitaria producida por diferentes especies del género *Schistosoma* incluidas dentro del phylum Platyhelminthes, clase Trematoda, subclase Digenea, familia *Schistosomatidae*. De las 21 especies descritas hasta el momento cinco especies parasitan al humano. El parásito en un trematodo sexuado que tiene como hospedador intermediario un caracol. La enfermedad se adquiere

cuando las cercarias presentes en el agua atraviesan la piel que se ha sumergido en ella. La esquistosomiasis intestinal la producen *Schistosoma mansoni*, *S. intercalatum*, *S. japonicum* y *S. mekongi*. Los parásitos adultos viven durante décadas en los plexos venosos intestinales. Los huevos producidos por la hembra se acumulan en la pared intestinal y se eliminan con las heces, o bien viajan por vía portal hasta el hígado donde se produce un granuloma de cuerpo extraño que finalmente se fibrosa. La esquistosomiasis urinaria la produce el *S. haematobium* que vive en los plexos perivesicales y los huevos se acumulan principalmente en el aparato urinario y se eliminan con la orina. En ocasiones los huevos producen reacciones inflamatorias en otras partes del organismo a nivel medular (*S. mansoni* o *S. haematobium*) y del sistema nervioso central (*S. japonicum*). La reacción cutánea a la penetración de las cercarias (prurito del bañista o dermatitis por cercarias) se puede producir al adquirir un *Schistosoma* de las especies ya mencionadas o esquistosomiasis aviares de distribución cosmopolita.

9.1.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos

Las manifestaciones clínicas son variadas, hay que señalar que aproximadamente la mitad de los pacientes están asintomáticos al diagnóstico. La clínica se puede dividir en manifestaciones agudas, que incluye la dermatitis cercariana y el síndrome de Katayama, y las manifestaciones crónicas.

La dermatitis por cercaria se caracteriza por el desarrollo de prurito en las primeras 24 horas siguientes a la penetración de las cercarias a través de la piel. Se debe a la reacción inmunológica provocada por la muerte de la cercaria a nivel cutáneo, que es una respuesta de hipersensibilidad mediada por IgE. Se observa con mayor frecuencia en viajeros y suele pasar desapercibida en residentes de áreas endémicas. El cuadro clínico es más florido en caso de producirse por la penetración de cercarias aviares.

La fiebre o síndrome de Katayama se produce entre las 2-8 semanas después de la exposición y se debe a una reacción de hipersensibilidad mediada por inmunocomplejos, que se desencadena tras la migración de la esquistosómula e inicio de la oviposición. Se caracteriza por fiebre, exantema, urticaria, tos, disnea y eosinofilia. En la radiografía de tórax se suelen presentar infiltrados pulmonares y engrosamiento bronquial. En la ecografía y la tomografía computarizada abdominal se presentan nódulos hepáticos hipoecogénicos o hipodensos. Habitualmente es autolimitada, aunque pueden persistir los síntomas más de dos meses, presentando diarrea, dolor abdominal, hepatoesplenomegalia, pérdida de peso, etc. El síndrome de Katayama se observa más frecuentemente en viajeros procedentes de áreas endémicas.

Las manifestaciones crónicas aparecen meses o años tras la infección. Se debe a la reacción granulomatosa en hígado, sistema urinario, intestino y otras localizaciones como pulmones y sistema nervioso. Aunque es más frecuente en residentes de áreas endémicas, las personas sin exposición previa (viajeros) pueden desarrollar esquistosomiasis crónica tras una corta exposición.

La afectación urinaria por *S. haematobium* se manifiesta con disuria, polaquiuria y hematuria, característicamente terminal, aunque en casos graves puede producirse durante toda la micción. Suele ser más sintomática en niños y adultos jóvenes. El cuadro se puede complicar con litiasis y sobreinfección bacteriana. Cuando evoluciona produce fibrosis y calcificación de vejiga y uréteres, que provoca ureterohidronefrosis, en la mayoría de los casos con función renal conservada. El dato analítico más relevante es la presencia de eosinofilia.

La afectación digestiva se localiza frecuentemente en intestino delgado y en recto, se debe a la infección por *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi* y *S. intercalatum* se produce al atravesar el parásito la pared intestinal, lo que provoca inflamación, ulceración, sangrados superficiales y pseudopólipos. Las manifestaciones más frecuentes son dolor abdominal, diarrea con o sin sangre, hiporexia, cuadros suboclusivos e incluso fístulas anorrectales.

La afectación hepatoesplénica se debe a una fibrosis periportal, que condiciona una hipertensión portal pre-sinusoidal sin nódulos de regeneración ni cirrosis. Se suele manifestar sin estigmas de hepatopatía crónica y con una función hepática conservada. En estadios avanzados se produce sangrado por varices, ascitis o

incluso encefalopatía hepática. El desarrollo de fibrosis puede tardar hasta 5-15 años. La co-infección con los virus de la hepatitis B y C puede acelerar el deterioro de la función hepática. La afectación hepatoesplénica es una manifestación clínica característica de niños y es menos frecuente en adultos.

Las manifestaciones genitales se producen sobre todo en mujeres, con lesiones ulcerativas e hipertróficas en vulva, vagina y cérvix, facilitando la transmisión de otras enfermedades infecciosas, como el VIH. Además, la afectación ovárica y/o trompas puede condicionar infertilidad. En varones se afectan los cordones espermáticos, el epidídimo y la próstata. El síntoma más frecuente es la hematospermia.

La clínica a nivel del sistema nervioso central, se debe a una migración aberrante de huevos y de los gusanos adultos, aunque esto último es sumamente infrecuente. La localización más frecuente es la medular, en forma de mielitis transversa aguda, desarrollando parestesias, paraparesia, hipoestesia, vejiga neurógena y/o dolor lumbar. Es poco habitual en las fases precoces en viajeros por *S. mansoni* y *S. haematobium*. La infección por *S. japonicum* puede desarrollar lesiones granulomatosas cerebrales que cursan con crisis comiciales o una encefalitis focal, sobre todo en residentes de zona endémica.

Las manifestaciones a nivel pulmonar se deben a una migración ectópica, lo que produce fibrosis de arterias pulmonares con hipertensión pulmonar e insuficiencia cardíaca de predominio derecho.

La afectación parenquimatosa renal, afecta específicamente al glomérulo, pudiendo originar glomerulonefritis, siendo el tipo más frecuente la glomerulonefritis mesangial.

Respecto a la epidemiología la esquistosomosis es una de las enfermedades más prevalente de las zonas tropicales y subtropicales del planeta, lo que tiene serias consecuencias en la salud global y produce un grave impacto económico y social en los países en desarrollo. Es endémica en 76 países según la OMS. Se calcula que 207 millones de personas están infectadas y 779 millones están en riesgo en todo el mundo. Se calcula que el 85% de la población infectada se encuentra en África subsahariana. De los pacientes infectados, 120 millones de personas están sintomáticas, 20 millones con enfermedad grave, y 280.000 mueren cada año. La mayoría de los casos importados procede de África subsahariana. La distribución geográfica de las diferentes especies de esquistosomas depende de diferentes factores ecológicos como el clima, la calidad del agua y otros que regulan la población de caracoles, así como los patrones del saneamiento y suministro de agua. La mayor prevalencia en áreas endémicas ocurre entre los adolescentes y disminuye generalmente en la edad adulta. Así, se calcula que el 60-80% de los casos activos se producen en niños en edad escolar y solo un 20-40% en adultos. Algunos autores señalan el gran impacto de la morbilidad causada por la esquistosomosis, reflejada en una pérdida de 3,3 millones de DALYs anuales.

9.1.3 Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de la esquistosomiasis humana se basa en datos epidemiológicos, clínicos, analíticos y radiológicos. Normalmente, estos datos no son suficientes para un diagnóstico inequívoco de esta parasitosis. Afortunadamente, en la actualidad disponemos de un amplio arsenal de técnicas diagnósticas, desde técnicas parasitológicas directas hasta métodos moleculares altamente sofisticados. Se pueden agrupar en tres categorías principales: i) el diagnóstico parasitológico directo, ii) el diagnóstico inmunológico, y iii) las basadas en la detección de ácidos nucleicos y técnicas moleculares.

9.1.3.1 Examen microscópico

Los métodos parasitológicos directos fueron los primeros empleados para el diagnóstico de la esquistosomosis. Son los métodos más utilizados y se consideran el estándar de oro para el diagnóstico. Están basados en la detección de huevos en heces (en el caso de la esquistosomosis intestinal y hepática) o en orina (en el caso de la esquistosomiasis urogenital). Este método permite identificar las diferentes especies de esquistosomas visualizando la morfología característica del huevo y evaluar la intensidad de la infección, aunque no son apropiados para el diagnóstico temprano de la enfermedad, ya que la puesta de huevos se inicia al menos a la cuarta semana tras la infección.

Para la detección microscópica de huevos de *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* y *S. mekongi* en heces se utiliza la técnica de Kato-Katz desarrollada en 1972 y que actualmente está recomendada por la OMS como estándar de oro. Es sencilla, de bajo coste, muy específica y puede ser realizada por personal con un entrenamiento relativamente básico. Se examina microscópicamente una muestra fresca de 50 mg de heces en extensión, pudiéndose llegar a detectar como positivas muestras con un mínimo de 20 huevos por cada gramo de heces. Sin embargo, cuando la carga parasitaria es baja (entre otros motivos por una eliminación de huevos fluctuante), la sensibilidad del test disminuye notablemente por lo que es conveniente: i) recoger al menos tres muestras de días consecutivos y ii) aumentar el número de láminas examinadas. Se han desarrollado otros métodos que se aplicarían cuando la muestra fresca ofreciera resultados negativos, como la concentración con formol-éter, la flotación con una solución saturada de cloruro sódico o la técnica del FLOTAC, la cual permite analizar una cantidad de muestra mayor, pero necesita cierto nivel de infraestructura en el laboratorio. Si se sospecha que el paciente presenta un bajo número de vermes se puede recurrir al test de eclosión, incubando las heces hasta conseguir la salida de los miracidios de los huevos, los cuales migrarán hacia una fuente de luz aplicada sobre la muestra. También es muy eficiente en infecciones de baja intensidad la técnica de separación de huevos en heces con Percoll®.

Para la detección de huevos de *S. haematobium* es preciso concentrar la orina. Clásicamente se realizaban métodos de centrifugación o sedimentación. En la actualidad, se utilizan técnicas de filtración, que permiten una estimación cuantitativa de la excreción de huevos. El principal problema es la baja sensibilidad, especialmente en infecciones leves. Por otro lado, la presencia de proteinuria y principalmente hematuria son indicadores que se han usado en el diagnóstico de la esquistosomiasis urogenital, con limitaciones importantes respecto a su especificidad.

Para el diagnóstico de la esquistosomiasis intestinal se puede utilizar la biopsia rectal, dado que aumenta la sensibilidad en aquellos pacientes con estudio de heces negativo. Para el diagnóstico de la esquistosomiasis genital se pueden realizar diferentes técnicas para la localización de huevos: en la mujer se puede practicar la inspección del moco cervical, biopsia y examen histológico de tejido cervical a través de espéculo; en el hombre, la técnica de elección sería el examen del semen, cuya sensibilidad se aproxima al 50%. La localización de huevos de *Schistosoma* spp. en otros fluidos y/o tejidos es más infrecuente y sería preciso la biopsia de los diferentes órganos afectados para el diagnóstico directo: piel, sistema nervioso central, etc.

9.1.3.2 Técnicas serológicas

La infección por esquistosomas es altamente inmunogénica y no es difícil demostrar la presencia de anticuerpos anti-esquistosomas en los sujetos infectados. Hay una gran variedad de técnicas inmunológicas con diferente nivel de sofisticación, y son particularmente útiles en situaciones de baja carga parasitaria cuando los tests parasitológicos directos no son diagnósticos. Se utilizan antígenos complejos principalmente de vermes adultos, fracciones antigénicas o antígenos recombinantes detectando antígenos circulantes del parásito o anticuerpos específicos contra él en diferentes fluidos (orina, suero, plasma o esputo). Muchas se están desarrollando con la finalidad de que sirvan como test a pie de paciente (*point-of-care tests*, POCT). Los métodos de inmunodiagnóstico, pueden ser tanto directos como indirectos, y presentan en general mayor sensibilidad que las técnicas utilizadas para el diagnóstico parasitológico directo. No obstante, continúan planteando problemas relacionados con la obtención de antígenos -muchas veces compleja- y la aparición de falsos positivos y negativos. Estas técnicas son capaces de diagnosticar infecciones por *S. mansoni* y *S. haematobium* y han resultado útiles en zonas de baja endemicidad.

Además, la detección inmunológica de la esquistosomiasis se retrasa habitualmente hasta la aparición de los correspondientes antígenos o anticuerpos, constituyendo en la fase aguda de la enfermedad una opción limitada para el diagnóstico. Además, muchas veces la persistencia de antígenos, y especialmente de anticuerpos tras una terapia eficaz, hacen que se detecten “falsos positivos” correspondientes a pacientes que ya han eliminado el parásito.

El enzimoimmunoanálisis ha utilizado antígenos somáticos de fase adulta de *Schistosoma bovis*, que detectan tanto infecciones producidas por *S. mansoni* como por *S. haematobium*, como fracciones microsomales

derivadas de *S. mansoni* (MAMA) y de *S. haematobium* (HAMA), que arrojan buenos resultados para su especie originaria pero pobres para otras especies. No obstante, han permitido diagnosticar infecciones humanas por *S. mansoni*, *S. haematobium* y *S. intercalatum* en inmigrantes subsaharianos, además de confirmar el diagnóstico en pacientes con fiebre de Katayama.

El test de precipitación circumoval o COPT detecta anticuerpos en suero de pacientes infectados empleando huevos del parásito liofilizados. Ha resultado ser sensible y específico y empleándolo junto con la microscopía ha mejorado notablemente la eficacia del diagnóstico. Las principales desventajas del COPT son la complejidad de la técnica y que el test continúa siendo positivo una vez que se ha eliminado el parásito del organismo. El test de inmunofluorescencia indirecta o IFI detecta anticuerpos en suero empleando secciones de gusanos adultos, huevos o cercarias mediante microscopía de fluorescencia. Se ha utilizado solo o en combinación con otros métodos de diagnóstico en zonas de baja prevalencia. Este test es de difícil aplicación ya que este tipo de microscopía y los reactivos, así como el entrenamiento de los técnicos de laboratorio, suponen una barrera para su uso en zonas endémicas. La técnica de hemaglutinación indirecta o IHA es capaz de detectar anticuerpos de pacientes infectados empleando eritrocitos recubiertos de antígenos de esquistosomas. Gracias a su simplicidad, este test se ha utilizado para estudiar la prevalencia y la vigilancia en áreas endémicas. Sin embargo, a parte del elevado título de anticuerpos tras el tratamiento, ha mostrado mucha reactividad cruzada con otras especies de helmintos, lo que implica una baja especificidad.

La técnica de ELISA utilizaba en un primer momento extractos crudos de adultos o huevos como antígenos, dando reactividad cruzada con otros helmintos. Posteriormente se han desarrollado ELISAs con proteínas o fracciones de proteínas purificadas para mejorar la especificidad de la técnica. Existe una proteína de *S. mansoni* denominada SmCFT (*Cercarial Transformation Fluid*), utilizada mediante ELISA para el diagnóstico de *S. mansoni* y *S. haematobium* y que posteriormente se adaptó como test de diagnóstico rápido o RDT (*Rapid Diagnostic Test*). La técnica mostró la misma sensibilidad que dos láminas de Kato-Katz para el diagnóstico de *S. mansoni* y una filtración de orina para *S. haematobium*. Sin embargo, es necesario evaluar esta técnica en otro tipo de situaciones, como en zonas de baja endemicidad o tras una campaña post-tratamiento. Actualmente existen diferentes *kits* comerciales basados en la detección de anticuerpos (ELISA e IHA), utilizándose en la práctica clínica particularmente en países no endémicos, para diagnosticar casos de esquistosomosis importada. No obstante, la especificidad de estos *kits* continúa siendo baja. La detección de antígenos de esquistosomas es un método de diagnóstico directo utilizado en diferentes fluidos biológicos (suero, orina, etc). Recientemente, el test comercial SEA-ELISA (que utiliza antígenos solubles de huevo) ha mostrado una sensibilidad y especificidad del 89% y 70%, respectivamente.

Los dos antígenos más empleados son el antígeno circulante catódico (CCA) y el antígeno circulante anódico (CAA), presentes en la fase adulta de los esquistosomas, y llamados así por su comportamiento cuando son sometidos a inmunoelectroforesis. Son antígenos género-específicos, es decir, idénticos para todas las especies de esquistosomas, por tanto, el diagnóstico sólo se puede realizar a nivel de género y se excretan durante la regurgitación de la sangre tras ser ingerida por los gusanos adultos. Se pueden detectar en sangre, orina e, incluso, en leche materna en el caso del CCA. Su sensibilidad oscila entre 65-87% y son útiles para evaluar la eficacia post-tratamiento ya que dejan de detectarse. Además, se identifican a la tercera semana post-infección, permitiendo realizar el diagnóstico en fase aguda. En los últimos años se utiliza una tira reactiva comercial como test de diagnóstico rápido que detecta CCA en orina para el diagnóstico de *S. mansoni*. Desafortunadamente, este test no es eficaz para la detección de *S. haematobium* y por tanto no es útil en áreas donde cohabitan ambas especies. Se cuestiona su aplicación en áreas de baja prevalencia, ya que su positividad está directamente relacionada con la intensidad de la infección. Sin embargo, ha demostrado su utilidad en zonas de media y alta endemicidad y se puede emplear para estimar la eficacia al tratamiento. También se ha empleado la tecnología UCP-LF (*Up-Converting Phosphor- Lateral Flow*) para detectar CAA en suero y orina y poder diagnosticar la esquistosomiasis urogenital de forma rápida y sencilla. Un estudio reciente demuestra que es más sensible que la microscopía. Sin embargo, requiere un mayor desarrollo técnico para su aplicación en condiciones de campo. Recientemente se ha comercializado un test para detectar CCA en orina utilizando tiras de nitrocelulosa (*dipstick*), aunque su sensibilidad es baja.

derivadas de *S. mansoni* (MAMA) y de *S. haematobium* (HAMA), que arrojan buenos resultados para su especie originaria pero pobres para otras especies. No obstante, han permitido diagnosticar infecciones humanas por *S. mansoni*, *S. haematobium* y *S. intercalatum* en inmigrantes subsaharianos, además de confirmar el diagnóstico en pacientes con fiebre de Katayama.

El test de precipitación circumoval o COPT detecta anticuerpos en suero de pacientes infectados empleando huevos del parásito liofilizados. Ha resultado ser sensible y específico y empleándolo junto con la microscopía ha mejorado notablemente la eficacia del diagnóstico. Las principales desventajas del COPT son la complejidad de la técnica y que el test continúa siendo positivo una vez que se ha eliminado el parásito del organismo. El test de inmunofluorescencia indirecta o IFI detecta anticuerpos en suero empleando secciones de gusanos adultos, huevos o cercarias mediante microscopía de fluorescencia. Se ha utilizado solo o en combinación con otros métodos de diagnóstico en zonas de baja prevalencia. Este test es de difícil aplicación ya que este tipo de microscopía y los reactivos, así como el entrenamiento de los técnicos de laboratorio, suponen una barrera para su uso en zonas endémicas. La técnica de hemaglutinación indirecta o IHA es capaz de detectar anticuerpos de pacientes infectados empleando eritrocitos recubiertos de antígenos de esquistosomas. Gracias a su simplicidad, este test se ha utilizado para estudiar la prevalencia y la vigilancia en áreas endémicas. Sin embargo, a parte del elevado título de anticuerpos tras el tratamiento, ha mostrado mucha reactividad cruzada con otras especies de helmintos, lo que implica una baja especificidad.

La técnica de ELISA utilizaba en un primer momento extractos crudos de adultos o huevos como antígenos, dando reactividad cruzada con otros helmintos. Posteriormente se han desarrollado ELISAs con proteínas o fracciones de proteínas purificadas para mejorar la especificidad de la técnica. Existe una proteína de *S. mansoni* denominada SmCFT (*Cercarial Transformation Fluid*), utilizada mediante ELISA para el diagnóstico de *S. mansoni* y *S. haematobium* y que posteriormente se adaptó como test de diagnóstico rápido o RDT (*Rapid Diagnostic Test*). La técnica mostró la misma sensibilidad que dos láminas de Kato-Katz para el diagnóstico de *S. mansoni* y una filtración de orina para *S. haematobium*. Sin embargo, es necesario evaluar esta técnica en otro tipo de situaciones, como en zonas de baja endemicidad o tras una campaña post-tratamiento. Actualmente existen diferentes *kits* comerciales basados en la detección de anticuerpos (ELISA e IHA), utilizándose en la práctica clínica particularmente en países no endémicos, para diagnosticar casos de esquistosomosis importada. No obstante, la especificidad de estos *kits* continúa siendo baja. La detección de antígenos de esquistosomas es un método de diagnóstico directo utilizado en diferentes fluidos biológicos (suero, orina, etc). Recientemente, el test comercial SEA-ELISA (que utiliza antígenos solubles de huevo) ha mostrado una sensibilidad y especificidad del 89% y 70%, respectivamente.

Los dos antígenos más empleados son el antígeno circulante catódico (CCA) y el antígeno circulante anódico (CAA), presentes en la fase adulta de los esquistosomas, y llamados así por su comportamiento cuando son sometidos a inmunoelectroforesis. Son antígenos género-específicos, es decir, idénticos para todas las especies de esquistosomas, por tanto, el diagnóstico sólo se puede realizar a nivel de género y se excretan durante la regurgitación de la sangre tras ser ingerida por los gusanos adultos. Se pueden detectar en sangre, orina e, incluso, en leche materna en el caso del CCA. Su sensibilidad oscila entre 65-87% y son útiles para evaluar la eficacia post-tratamiento ya que dejan de detectarse. Además, se identifican a la tercera semana post-infección, permitiendo realizar el diagnóstico en fase aguda. En los últimos años se utiliza una tira reactiva comercial como test de diagnóstico rápido que detecta CCA en orina para el diagnóstico de *S. mansoni*. Desafortunadamente, este test no es eficaz para la detección de *S. haematobium* y por tanto no es útil en áreas donde cohabitan ambas especies. Se cuestiona su aplicación en áreas de baja prevalencia, ya que su positividad está directamente relacionada con la intensidad de la infección. Sin embargo, ha demostrado su utilidad en zonas de media y alta endemicidad y se puede emplear para estimar la eficacia al tratamiento. También se ha empleado la tecnología UCP-LF (*Up-Converting Phosphor- Lateral Flow*) para detectar CAA en suero y orina y poder diagnosticar la esquistosomiasis urogenital de forma rápida y sencilla. Un estudio reciente demuestra que es más sensible que la microscopía. Sin embargo, requiere un mayor desarrollo técnico para su aplicación en condiciones de campo. Recientemente se ha comercializado un test para detectar CCA en orina utilizando tiras de nitrocelulosa (*dipstick*), aunque su sensibilidad es baja.

9.1.3.3 Detección de ácidos nucleicos

La detección de ADN de esquistosomas en muestras de heces, orina o biopsias de tejidos se usa como diagnóstico altamente sensible y específico. La PCR convencional diseñada sobre segmentos de genes nucleares es más sensible que la microscopía, tanto en heces para el diagnóstico de *S. mansoni*, como en orina para el diagnóstico de *S. haematobium*. Se ha aumentado la sensibilidad de la técnica estudiando genes mitocondriales, debido al elevado número de copias que existen en cada célula. Además, al ser secuencias únicas de cada especie, presentan un alto grado de especificidad. En general, presentan reacciones cruzadas con otros helmintos. Se han desarrollado variantes de PCR como son la Touchdown-PCR o ELISA-PCR con excelentes resultados.

La técnica de PCR a tiempo real (qPCR) presenta una serie de ventajas en comparación con la PCR convencional, es más rápida, detecta concentraciones más bajas de ADN, y permite realizar un análisis cuantitativo. La qPCR se ha empleado para diferenciar entre las diferentes especies de esquistosomas y estimar la intensidad de la infección. Se ha desarrollado una qPCR-múltiple que permite la amplificación simultánea de ADN de *S. mansoni* y *S. haematobium*. Además, podría presentar utilidad en el diagnóstico del síndrome de Katayama como de la esquistosomosis crónica.

La detección mediante PCR del ADN libre circulante o CFPD (*Cell-Free Parasite DNA*) se ha utilizado también en el diagnóstico molecular de la esquistosomiasis. Este ADN proviene de la muerte de las esquistosomas durante su migración, de la renovación del tegumento de los gusanos adultos o de la desintegración de los huevos inactivos. Una vez que el CFPD está en circulación puede detectarse en suero y plasma. Además, pequeños fragmentos de ADN se pueden filtrar y aparecer en la orina, saliva o líquido cefalorraquídeo. Esta técnica es más sensible que los métodos parasitológicos directos y que la detección de antígenos en orina, demostrando su utilidad en la fase prepatente. Además, muestra utilidad para el diagnóstico de neuroesquistosomosis.

Los micro-ARNs (miARNs) se han demostrado útiles como biomarcadores de la infección, estos miARNs son pequeñas moléculas de ARN no codificantes producidas por diferentes tipos de seres vivos que desarrollan un papel fundamental en procesos fisiológicos y patológicos. Se incorporan en el complejo silenciador inducido por ARN mediante unión específica al ARN mensajero, inhibiendo su traducción y desestabilizando su estructura. Se han caracterizado e identificado miARNs específicos de esquistosomas detectándose a partir de la octava semana tras la infección. También se ha analizado el perfil de los miARNs de los hospedadores definitivos; sin embargo, dado que estas moléculas pueden verse alteradas por otras infecciones es necesario realizar más estudios para evaluar su utilidad en el diagnóstico de la esquistosomiasis.

El uso de la PCR y sus variantes están siendo de gran utilidad y algunos autores las proponen como técnicas estándar de oro para el diagnóstico de la esquistosomiasis. No obstante, son técnicas con un coste elevado, requieren de personal y equipamiento especializados por lo que todavía su uso queda restringido a laboratorios de referencia. No obstante, puede ser de gran utilidad para el diagnóstico de esquistosomiasis importadas en países industrializados.

Además, últimamente se están desarrollando recientemente tests de diagnóstico rápidos y sencillos basados en métodos oligocromatográficos (*oligochromatographic dipstick tests*) que pueden realizarse en 10 minutos y que pueden detectar hasta 10 fg de ADN genómico.

Por último, en los últimos años, el método de amplificación isotérmica mediante bucles, denominado LAMP, permite la amplificación de un pequeño número de copias de ADN en condiciones isotérmicas, obteniendo productos que pueden ser directamente visualizados, mediante turbidez, fluorescencia o por métodos colorimétricos. La técnica precisa del diseño de cuatro primers para amplificar seis regiones distintas de ADN y así asegurar una amplificación específica. La gran cantidad de material genético generado y el anillamiento de los múltiples cebadores hacen que la sensibilidad y la especificidad sean muy elevadas. El hecho de que

la amplificación tenga lugar a temperatura constante permite que la reacción pueda realizarse en un simple termobloque o baño de agua, haciendo innecesario el uso de aparataje más sofisticado como los termocladores. Las especiales características del LAMP de sensibilidad, especificidad, rapidez, bajo coste y fácil conservación de sus reactivos, convierten al LAMP en ideal, para las ser una prueba de diagnóstico a pie de paciente (POCT, pruebas diagnósticas desarrolladas en el laboratorio pero que se realizan "en o cerca del sitio de atención al paciente"), permitiendo un resultado rápido y, secundariamente, un tratamiento precoz. Esta técnica es ideal sobre todo en zonas endémicas con bajos recursos.

9.2 FASCIOLOSIS

9.2.1 Características generales

La fasciolosis es una infección causada por dos trematodos, *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica* y está considerada como una enfermedad tropical desatendida. Se transmite habitualmente tras ingerir alimentos contaminados (plantas acuáticas) y, tanto los animales como los humanos, la contraen de la misma manera. Los hospedadores definitivos son ovejas y ganado; los humanos actúan como hospedadores paraténicos, por lo que no suelen completar el ciclo biológico. Ambos parásitos son hermafroditas, tienen ciclos de vida similares, causan cuadros agudos y crónicos y presentan una elevada morbilidad. Además, la fasciolosis presenta un impacto económico significativo por pérdidas en la industria ganadera. El trematodo adulto de *F. hepática* es plano, de color marrón, con forma de hoja y mide alrededor de 3x1,5 cm. Los huevos son grandes y de color pardo amarillento, operculados y miden 140x75 µm. Pasan al intestino, y son evacuados por las heces completando su desarrollo en agua dulce. A los pocos días los miracidios invaden a las especies de caracol específicas, que actúan como huéspedes intermediarios, dentro de los cuales se produce la replicación asexual, dando lugar a la liberación de cercarias. Éstas se enquistan como metacercarias en plantas de ámbito acuático, entre las que se cuentan los berros, lechugas de agua, la menta y el perejil. Tanto si están en las plantas como si flotan libremente en agua contaminada, las metacercarias se liberan después de ser ingeridas y las larvas penetran en el peritoneo a través de la pared intestinal, desde donde migran a la cápsula hepática y se alimentan del parénquima hepático antes de entrar en la vía biliar. Es necesario que transcurran aproximadamente entre 3 y 4 meses desde la infestación a la puesta de huevos en seres humanos. Los trematodos adultos pueden vivir hasta 10 años.

9.2.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos

Más de la mitad de los casos de fasciolosis son asintomáticos. La infestación por *F. hepatica* puede clasificarse según la clínica en aguda o crónica, correspondientes a i) la fase migratoria hepática y ii) a la presencia de los vermes en los conductos biliares.

Los síntomas de la fase aguda corresponden a la migración inicial aguda del trematodo durante la fase larvaria. Aparecen entre 6 y 12 semanas después de la ingestión de las metacercarias y pueden durar 4 meses o más. Entre las manifestaciones clínicas descritas destacan el dolor abdominal, fiebre intermitente, cefalea, malestar general, síntomas constitucionales y urticaria. Entre el 10-15% de los enfermos pueden presentar tos y dolor torácico, acompañados de un derrame pleural eosinófilo. El signo más destacado es la hepato-esplenomegalia. A nivel analítico destacan la presencia de eosinofilia, leucocitosis, anemia, ictericia y elevación de las pruebas de función hepática. En este momento hasta el 80% de los pacientes presentan huevos en las heces. La tomografía computerizada (TC) y la resonancia magnética (RM) evidencian lesiones hipodensas que miden 1 cm de diámetro o más y que se desplazan a varias partes del hígado a lo largo de un período de varias semanas. Los vestigios lineales, hipodensos, tortuosos y ramificados, que se observan bajo la cápsula, corresponden a procesos de necrosis. A lo largo del recorrido de la migración larvaria se aprecian, además, infiltrados inflamatorios eosinófilos. Transcurridas varias semanas, o incluso meses, los síntomas y signos de la fase aguda remiten a medida que los vermes penetran en los conductos biliares.

En la fase crónica los enfermos suelen estar asintomáticos. Las manifestaciones clínicas son las de las complicaciones de la fasciolosis, con una clínica similar a un cólico biliar y/o una colecistitis, como consecuencia de la inflamación y la obstrucción intermitente de los conductos biliares; ocasionalmente se puede observar

una colangitis ascendente. Asimismo, se han descrito pancreatitis hasta en el 30% de los casos. La eosinofilia y la anemia en edad pediátrica suelen ser frecuentes. La ecografía o la colangiografía retrograda endoscópica (CPRE) pueden detectar masas en el colédoco, correspondientes a vermes adultos. A diferencia de otras infecciones por trematodos, la fasciolosis no se ha asociado con procesos neoplásicos.

La fasciolosis ectópica se produce por una afectación extrahepática. Las manifestaciones clínicas dependerán de los órganos y tejidos afectos. Se origina por la migración anómala de los gusanos juveniles por vía hematogena o a través de los tejidos blandos, pudiendo producir clínica de larva migrans cutánea o visceral, y presentan cuadros similares a los observados en estrogiloidiosis, teniasis y gnatostomiasis. La migración puede dar lugar a la aparición de nódulos (1 a 6 cm de diámetro) eritematosos, dolorosos, migratorios, con una infiltración de eosinófilos y células mononucleares y daño tisular secundario. El sitio más común es el tejido celular subcutáneo de la pared abdominal, aunque se ha descrito en músculos, corazón, pulmones, aparato digestivo, tracto genitourinario, piel, ojos y sistema nervioso central. Asimismo, se han descrito cuadros de linfadenopatía generalizada.

Respecto a la epidemiología de la fasciolosis, esta es una enfermedad de distribución mundial, estando descrita en más de 75 países en todo el mundo. Así, se estima que entre 2,4 a 17 millones de personas están infectadas y 91 millones de personas están en riesgo. Mientras la distribución de *F. hepática* es mundial, *F. gigantica* tiene una distribución más limitada a áreas tropicales (en muchas ocasiones en zonas de África y Asia su distribución se solapa con la de *F. hepática*). Se han comunicado casos en todos los continentes, excepto en la Antártida, registrándose las mayores tasas en las tierras altas de América del Sur (Bolivia, Perú), el valle del Nilo (Egipto), la cuenca del mar Caspio, así como el este de Asia y el sureste de Asia. Ningún país puede considerarse libre del riesgo de fasciolosis.

El patrón epidemiológico de la fasciolosis es bastante variado: la infección generalmente tiene un patrón hipoendémico, con niveles de prevalencia bajos y estables entre una población definida. Es posible que se produzcan brotes esporádicos entre tales poblaciones: estos generalmente están relacionados con cambios repentinos en las condiciones climáticas que aumentan el ciclo de vida del parásito o del caracol, o de ambos. Asimismo, la epidemiología de la fasciolosis está estrictamente vinculada a las características geográficas y ambientales del área donde ocurre la transmisión. Se pueden distinguir diferentes patrones: esto sugiere que la capacidad de *F. hepática* para adaptarse a los nuevos huéspedes definitivos y a los nuevos ambientes, como el altiplano boliviano a 3.800-4.100 metros, es la responsable de su continua diseminación a partir de su localización original en Oriente Próximo y Europa. En África y Asia, donde están presentes *F. hepática* y *F. gigantica*, son posibles infecciones mixtas. En Asia, se ha descrito la hibridación entre las dos especies que ocurren tanto en humanos como en animales coinfectados. La descendencia resultante de dicha hibridación se caracteriza por características morfológicas intermedias entre las dos especies, así como por diferentes ploidías (diploides, triploides y mixoploides); tales gusanos son con frecuencia no fértiles.

9.2.3 Diagnóstico de laboratorio

El retraso diagnóstico es frecuente. El diagnóstico definitivo se establece mediante la observación de la presencia de huevos en muestras de heces, bilis o aspirados duodenales, o por recuperación de vermes adultos en abordajes quirúrgicos.

En la fase aguda de la infección se basa en el cuadro clínico, la epidemiología, y las imágenes observadas en la TC o la RM, que son características. En la fase aguda, el examen de heces es limitado, ya que no se excretan huevos durante la etapa invasiva de la infección. Tampoco es útil la búsqueda de huevos en las heces en el contexto de una fasciolosis ectópica. Además, a menudo, los huevos son indetectables durante la fase crónica. No está claro si esto es debido a que las técnicas utilizadas son poco sensibles para infecciones leves (<100 huevos/gramo) o a la eliminación intermitente de los huevos. La CPRE y las técnicas quirúrgicas (laparotomía) permiten la visualización de las lesiones de fasciolosis aguda y crónica y, a veces, huevos o gusanos en el sistema hepatobiliar. La biopsia hepática, o de los nódulos de la piel o de cualquier otra localización rara vez muestran huevos o trematodos adultos. Los cambios histopatológicos que pueden sugerir fasciolosis incluyen cristales de Charcot-Leyden, eosinófilos y múltiples focos calcificados. Además, hay datos de laboratorio que

pueden ayudar en el diagnóstico. Así, en infecciones agudas investigaremos la presencia de eosinofilia, leucocitosis y reactantes de fase aguda elevados. En la fase crónica de la infección pueden presentarse anemia, hipergammaglobulinemia, hipertransaminasemia, hiperbilirrubina y fosfatasa alcalina elevada, aunque no son hallazgos constantes. Se debe obtener un historial dietético cuidadoso (ingestión de berros o consumo de vegetales crudos lavados en agua potencialmente contaminada), útil sobre todo en la investigación de brotes. El diagnóstico de fasciolosis conlleva la evaluación del resto de miembros de una familia.

9.2.3.1 Examen microscópico

La microscopía de heces sigue siendo el método más utilizado a pesar de que es laboriosa, es operador-dependiente y presenta una baja sensibilidad. Los huevos de *F. hepatica* son ovales, de color amarillo-marrón, y miden de 130 a 150 μm de largo por 60 a 90 μm de ancho. La diferenciación de huevos de *F. hepatica*, *F. gigantica* y *Fasciolopsis buski* es muy difícil. El examen de heces debe ser de forma seriada debido a la excreción intermitente de los huevos. Se debe realizar mediante diferentes métodos como la coloración con eosina o con lugol. Los métodos de concentración como el Ritchie, Flotac o Faust y el Kato-Katz facilitan la identificación al presentar una mayor sensibilidad, sobre todo en infecciones de baja carga. Hay que señalar la falta de relación entre recuentos de huevos por gramo de heces y la carga parasitaria.

Hay que destacar que en el contexto de una fasciolosis ectópica o en la fase aguda (debido a la inutilidad de las heces en este periodo para realizar el diagnóstico) puede ser necesaria una prueba serológica, el análisis de las muestras quirúrgicas, o del contenido duodenal y/o la bilis, siendo en este caso la estrategia diagnóstica más adecuada para la detección y la estimación de la intensidad de la infección.

9.2.3.2 Técnicas serológicas

Las pruebas serológicas se pueden evaluar durante todos los períodos de la enfermedad, siendo especialmente útiles durante la infestación aguda, ya que los síntomas se desarrollan entre 1 y 2 meses antes de que los huevos sean detectables en las heces, lo que permite la confirmación de la infección 5-7 semanas antes del diagnóstico parasitológico directo en heces. Asimismo, son útiles en la enfermedad ectópica, así como en etapas crónicas con poca o ninguna producción de huevos. Las pruebas serológicas incluyen hemaglutinación indirecta, fijación del complemento, contraelectroforesis, análisis de inmunofluorescencia, análisis de inmunosorción enzimática (ELISA), técnicas como inmunoensayos enzimáticos, inmunotransferencia (empleando antígenos de todo el verme), coproantígenos y antígenos de excreción/secreción (E/S) del parásito. La mayoría presenta una sensibilidad excelente (> 90%), aunque la especificidad es menor debido a los problemas de reactividad cruzada con otros helmintos. La menor especificidad se puede evitar mediante el uso de antígenos específicos purificados, tratados con cistatina, placas o subclases de anticuerpos específicos. Los ensayos basados en ELISA, especialmente los que usan antígenos específicos de género, han reemplazado en gran medida a otras técnicas porque son sensibles, rápidos y cuantitativos. Se han utilizado una gran variedad de antígenos diferentes, como antígenos excretores/secretores (E/S), CL1, SAP2, FhSAP2 y Fas2 (que diferencia la infección aguda de la infección crónica o pasada). Hay un ELISA que emplea una forma recombinante de la catepsina L1 de *F. hepatica* (una proteasa) que muestra una sensibilidad y especificidad del 99,9%. Otros muchos antígenos han sido evaluados con resultados variables. Los *Centers for Disease Control* (CDC) recomiendan inmunoensayos enzimáticos (EIA) con antígenos excretores/secretores (E/S) combinados e inmunotransferencia dirigida a anticuerpos IgG contra la proteína FhSAP2 recombinante para la confirmación de resultados positivos. A diferencia de otras infecciones, el tratamiento eficaz a menudo se correlaciona con una disminución en los títulos de ELISA, aunque los anticuerpos pueden ser detectables durante años después de la infección, por lo que los ensayos tienden a detectar solo infecciones activas y la serología debería volver a ser negativa después de un año de tratamiento eficaz.

9.2.3.3 Detección de ácidos nucleicos

Actualmente no se dispone de una PCR comercial, a pesar de los resultados de las diferentes PCR utilizadas, que muestran una alta sensibilidad y especificidad, y proporcionan una buena correlación con el recuento de huevos fecales. Así, algunas PCR detectan ADN en el 50% de pacientes con fasciolosis y microscopía negati-

va. La PCR dúplex, y la PCR en tiempo real muestran resultados similares. La mayor utilidad de la PCR es la diferenciación entre la infección por *F. hepatica* y *F. gigantica*, dado que no se puede distinguir por la clínica, los hallazgos patológicos, los resultados directos ni por diferentes métodos inmunológicos. Así, recientemente se ha podido diferenciar entre infecciones por *F. hepatica* y *F. gigantica* mediante técnicas de PCR-RFLP en las heces, utilizando diferentes enzimas de restricción *Avall*, *Drall*, *Hsp92II* y *Rcal*. Desafortunadamente los ensayos de PCR-RFLP no han mostrado su utilidad en infecciones mixtas.

9.3 TENIASIS

9.3.1 Características generales

La teniasis es la infección intestinal causada por tres especies de cestodos: *Taenia solium*, *Taenia saginata* y *Taenia asiatica*. Está incluida en la lista de la OMS de enfermedades tropicales desatendidas y se considera reemergente en la actualidad debido a factores como el incremento de viajeros e inmigrantes. El principal mecanismo de transmisión es el consumo de carne infectada cruda o poco cocinada procedente del ganado porcino doméstico (*T. solium*), bovino (*T. saginata*) y porcino silvestre u otros animales (*T. asiatica*). El hombre actúa como único hospedador definitivo. La cisticercosis se produce cuando el ser humano ingiere huevos de *T. solium*, pudiendo causar efectos devastadores para la salud. En general, la infección por *T. asiatica* y *T. saginata* tiene poca repercusión sobre la salud humana.

9.3.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos

La mayoría de los pacientes infectados por *T. solium*, *T. saginata* o *T. asiatica* están asintomáticos. Cuando se producen manifestaciones, predominan los síntomas digestivos. En la mayoría de ocasiones son síntomas leves e inespecíficos, como dolor abdominal, diarrea, estreñimiento, náuseas o vómitos. En algunas circunstancias los pacientes expulsan las proglótides con las heces. Suelen aparecer alrededor de 8 semanas después de ingerir la carne que contiene cisticercos, una vez que la tenia se ha desarrollado completamente en el tubo digestivo. Se considera que, sin tratamiento, la infección con *T. solium* puede persistir durante más de 20 años. En las helmintosis intestinales la eosinofilia es mucho menos frecuente respecto a las tisulares o hemáticas y, dentro de las últimas, menos frecuente en las cestodosis larvianas (hidatidosis o cisticercosis).

En el caso de la cisticercosis, el periodo de incubación es variable, y las personas infectadas pueden permanecer asintomáticas durante años. Se pueden desarrollar nódulos visibles a nivel subcutáneo, en los músculos, los ojos y el sistema nervioso central. La formación de quistes en el cerebro se conoce como neurocisticercosis, que puede ser asintomática o cursar con diversos síntomas y signos, según la respuesta inmunitaria del huésped, el número, el tamaño, el estadio y la localización de las lesiones. Entre las manifestaciones clínicas destacan: cefalea crónica, ceguera, epilepsia, hidrocefalia, meningitis, demencia e incluso la muerte del paciente. La neurocisticercosis es la causa prevenible de epilepsia más frecuente en el mundo, y causa el 30% de los casos de epilepsia en países endémicos. A nivel global se estima que entre 2,56 y 8,30 millones de personas padecen neurocisticercosis.

El impacto global de la teniasis/cisticercosis de *T. solium* es evidente, aunque los datos disponibles respecto a su epidemiología y a su distribución geográfica son limitados. De este modo, a nivel mundial, la infección por *T. solium* es la primera parasitosis transmitida por alimentos, y la principal causa de muerte de una parasitosis de transmisión alimentaria. Esta infección tiene un gran impacto en la salud pública y en la economía de muchas comunidades rurales, además de reducir el valor de mercado del ganado vacuno y porcino. Según la OMS en el año 2015, la morbilidad-mortalidad causada por las teniasis/cisticercosis, alcanzó aproximadamente los 2,8 millones de años de vida ajustados por discapacidad (DALYs). Las teniasis presentan una elevada endemia en América Central y del Sur, África y Asia. En Europa, están descritos casos de teniasis en doce de los dieciocho países de Europa occidental. Asimismo, la cisticercosis humana está presente en todos los países de Europa occidental, excepto en Islandia. La Península Ibérica es una de las zonas de mayor impacto, fundamentalmente por *T. saginata*, aunque en Portugal y Extremadura continúan detectándose casos autóctonos de *T. solium* y de cisticercosis. En Europa la infección por *T. solium* es la décima enfermedad parasitaria transmitida por alimentos y la teniasis por *T. saginata* es la decimotercera.

9.3.3 Diagnóstico de laboratorio

Las distintas tenias no presentan datos específicos que orienten para su diagnóstico. Se han utilizado distintos métodos microscópicos, inmunológicos y moleculares para detectar y diferenciar entre cada especie. La combinación de dos o más métodos diagnósticos parece proporcionar una mayor sensibilidad. Las técnicas parasitológicas directas han sido clásicamente las más utilizadas; consisten principalmente en la detección de la fase de huevo en muestras de heces mediante análisis coprológico. El estudio de la morfología de los huevos no permite la diferenciación entre especies de *T. solium* y *T. saginata*, pues son idénticos, lo cual es particularmente importante, dados los riesgos asociados a la infección por *T. solium*. Hay que señalar que la observación directa en muestras fecales de las ramificaciones laterales uterinas de las proglótides grávidas permite el diagnóstico de especie. Como inconvenientes presentan la excreción intermitente de los elementos parasitarios, su falta de eliminación durante los tres primeros meses de la infección y que el uso de antiparasitarios provoca la desintegración de la parte proximal del gusano y la pérdida del escólex, lo que no siempre permite una precisa identificación entre especies ya que dependen en gran medida de que estén intactos durante su análisis.

En general el diagnóstico de neurocisticercosis es difícil, debido, entre otros motivos, a la gran variabilidad clínica, siendo especialmente complicado en países con bajos recursos, por la ausencia de pruebas de imagen y estudios inmunológicos apropiados. Para realizar el diagnóstico de neurocisticercosis hay que valorar de forma conjunta los datos clínicos, epidemiológicos, la neuroimagen, los análisis bioquímicos del líquido cefalorraquídeo (LCR) y la detección de anticuerpos en el suero y en el LCR. Hoy en día, se han desarrollado una amplia variedad de pruebas de inmunodiagnóstico, con resultados variables.

9.3.3.1 Examen microscópico

Los huevos de las diferentes especies tienen un tamaño entre 31-43 μm , son esféricos, no operculados y poseen una capa radial estriada que contiene una oncosfera con 6 ganchos. Al ser indistinguibles desde el punto de vista morfológico, no sirven para el diagnóstico de especie. Las proglótides eliminadas poseen rasgos morfológicos diferenciales que sirven para distinguir entre las distintas especies. Para teñir las proglótides se usan habitualmente métodos especiales, como tinta china. Así, menos de 15 ramas y gruesas identifican a la *T. solium*, mientras que más de 15 ramas y finas son características de *T. saginata*. Las proglótides se colocarán en agua para su relajación y las ramificaciones uterinas se pueden ver directamente aplastándolas entre dos portaobjetos (15-20 ramas en *T. saginata*, 7-13 en *T. solium*). Una vez relajada la musculatura de la proglótide, puede facilitarse la visualización introduciendo tinta china por el poro genital con una jeringa de insulina con aguja de punta roma o inyectando una pequeña cantidad de tinta china en la proglótide. Todas estas manipulaciones deben realizarse con extremada precaución, siempre con guantes sobre papel de filtro desechable, ya que los huevos de *T. solium* son infectantes y pueden causar cisticercosis.

9.3.3.2 Técnicas serológicas

Para la identificación de las diferentes especies de cestodos intestinales se han utilizado en los últimos años pruebas de detección de coproantígenos específicos mediante técnicas de enzimoimmunoensayo de captura, lo que permite la detección de antígenos específicos de género (*T. saginata* y *T. solium*), con la ventaja de no presentar reacciones cruzadas con otros helmintos. La detección de los niveles de coproantígenos es independiente de la presencia o del número de huevos. Los coproantígenos no se detectan en heces tras una semana de tratamiento y son estables durante días en muestras fecales no fijadas a temperatura ambiente, y durante periodos muy largos (de años) en muestras congeladas o fijadas con formalina a temperatura ambiente. Los niveles de sensibilidad del ensayo dependen del formato del mismo (microplaca o *dipstick*) y de la calidad del suero de conejo usado en su producción. En cuanto a su aplicación, tienen más utilidad en el diagnóstico de *T. solium*, dado que el de *T. saginata*, por su mayor fecundidad y la expulsión activa de proglótides, es más fácil de llevar a cabo por los métodos convencionales. El uso de esta prueba aumenta significativamente el número de casos diagnosticados, en comparación con los estudios microscópicos. Para el diagnóstico serológico de la infección por *T. solium* se ha utilizado la detección de anticuerpos en el suero sanguíneo.

Los ensayos serológicos utilizan principalmente antígenos recombinantes, como rTSES33 y rTSES38. La detección de anticuerpos circulantes específicos de especie mediante inmunoblot ha demostrado poseer una alta especificidad y sensibilidad, además de ofrecer la posibilidad de solucionar los problemas derivados del uso de coproantígenos parasitarios. Permiten un diagnóstico de especie, evitan el riesgo biológico en la recogida de heces y ofrecen la posibilidad, en combinación con otras técnicas de inmunodiagnóstico, para diagnosticar la cisticercosis, siendo necesaria una sola muestra de suero para diagnosticar ambos estadios de la infección por *T. solium*. En cuanto al inmunodiagnóstico, existen estudios que demuestran la validez del inmunoensayo como método de identificación específica de oncosferas de *T. solium*, empleando un anticuerpo monoclonal especie-específico de especie. Asimismo, hay que señalar que la mejor técnica para la detección de anticuerpos específicos para *T. solium* en suero es la inmunoelectrotransferencia enzimática (EITB), que utiliza una fracción enriquecida de glucoproteínas de *T. solium* de origen porcino. En pacientes con dos o más quistes viables en el sistema nervioso, tiene una especificidad del 100% y una sensibilidad del 98%. Sin embargo, dado que la detección de anticuerpos en suero puede producir un resultado positivo en pacientes con cisticercosis extraneural o en aquellos pacientes expuestos, pero sin desarrollo de la infección, los resultados de todas las pruebas basadas en la detección de anticuerpos deben evaluarse con precaución. Entre los ensayos de captura de antígenos, especialmente los realizados en LCR, los sistemas de anticuerpos monoclonales HP10 y B158/B60 son específicos y se utilizan en el seguimiento de la neurocisticercosis complicada y en estudios epidemiológicos en zonas endémicas.

9.3.3.3 Detección de ácidos nucleicos

Para la identificación de las diferentes especies de cestodos intestinales en los últimos años se han desarrollado diferentes técnicas de PCR. El inconveniente de estas técnicas es que para su realización se necesita la presencia de huevos y/o proglótides en las mismas, y sólo en caso de tener únicamente huevos o que las proglótides estuvieran muy deterioradas, aportarían ventajas destacables respecto a un buen estudio morfométrico. En general, los estudios de PCR muestran una excelente sensibilidad y especificidad, y están dirigidos a diversas regiones genómicas para diferenciar entre las distintas especies. Se incluyen métodos de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción de PCR (RFLP), sondas de ADN específicas de la especie (mediante secuencias repetitivas de ADN ribosómico, ADN mitocondrial y gen del antígeno 2), amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) y PCR anidada/múltiple. La PCR múltiple destaca al detectar (por diferencias encontradas en la secuencia HDP2) bandas de 474, 629 y 706 pares de bases para amplificar ADN de *T. solium*, *T. saginata* y *T. asiatica* respectivamente. Otras técnicas usan los cebadores dirigidos al gen de la subunidad 1 del citocromo c oxidasa mitocondrial (cox1) de las tres especies de *Taenia*. En general, estas técnicas no están disponibles para un diagnóstico de rutina. Respecto a la neurocisticercosis, se ha aplicado igualmente PCR convencional y PCR en tiempo real (con LCR o tejido de biopsia) con resultados altamente específicos y relativamente sensibles. En particular, la amplificación mediante PCR del elemento repetitivo pTsol9 del genoma del parásito en el LCR de pacientes muestra una sensibilidad del 95,9% y una especificidad variable (80-100%).

9.4 HIDATIDOSIS

9.4.1 Características generales

La hidatidosis humana o equinococosis quística (EQ) es una zoonosis causada por *Echinococcus granulosus sensu lato*, un cestodo cuyo hospedador definitivo es el perro, siendo el hombre un hospedador intermediario accidental. Debido a la especial afectación en áreas desfavorecidas, a su impacto en términos de morbilidad, y a la escasa inversión en investigación, está incluida en el listado de “Enfermedades Tropicales Desatendidas” de la OMS. En la actualidad, y a pesar de las recomendaciones de la OMS, no existe un consenso en el manejo de la EQ, siendo además muy complejo. Fundamentalmente, hay tres tipos de tratamientos, en muchas ocasiones complementarios entre sí: i) la cirugía, ii) las técnicas percutáneas y, iii) los fármacos antiparasitarios.

9.4.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos

El espectro clínico de la EQ es muy amplio, con una fase aguda post-infección silente. Así, sólo el 50% de los pacientes están sintomáticos al diagnóstico. Esto se debe, entre otros motivos, al lento crecimiento de los

quistes (1-5 cm/año), pudiendo presentar periodos de latencia de hasta 50 años (media 10 años). Además, el tamaño de los quistes varía ostensiblemente, se denominan quistes gigantes a los mayores de 10 cm., estos se localizan más frecuentemente en los pulmones, debido su estructura elástica, que facilita el crecimiento, y más frecuentemente en niños que en adultos. La infección se suele adquirir en la infancia, y es generalmente en la edad adulta cuando se manifiesta o se detecta de forma accidental al realizar estudios de imagen por otros motivos.

Las manifestaciones clínicas de la EQ dependerán de muchos factores, entre los que destacamos: i) el genotipo del *Equinococcus* spp. (así, por ejemplo, el G8 se localiza preferentemente en el pulmón y crece lentamente mientras que el genotipo 6 tiene tropismo cerebral), ii) del órgano afecto, iii) del número de quistes, iv) del tamaño de las lesiones, v) de la respuesta inmunitaria del hospedador, vi) de la integridad de la pared quística. De forma general, el 40-80% de los quistes se localizan en el hígado (principalmente en el lóbulo derecho); los quistes pulmonares representan el 10-30% de los casos y los localizados en otros órganos (bazo, riñón y vías urinarias, cavidad abdominal, corazón, cerebro, hueso, tejido celular subcutáneo, músculos y páncreas) alcanzan cifras en torno al 4-20% del total. En el 20% de los casos la localización es multiorgánica. Los síntomas más frecuentes son dolor abdominal/torácico, ictericia, tos y disnea. Raramente la EQ se sitúa a otros niveles como en los ovarios (0,6-0,9%); cuando esto ocurre habitualmente son asintomáticos, aunque pueden producir dolor y distensión abdominal, alteraciones menstruales, metrorragias o infertilidad. Otras localizaciones infrecuentes se describen a nivel tiroideo y/o parotídeo, causando aumento de la glándula y compresión de estructuras que provocan dolor, disnea, distrés respiratorio, disfonía, disfagia, perforación de la tráquea e incluso muerte por reacciones alérgicas. La afectación ocular puede ser orbitaria, produciendo proptosis y diplopía, o subretiniana causando panuveitis. En glándulas suprarrenales puede producir dolor abdominal y lumbar, masa palpable abdominal e incluso hipertensión por presión sobre la glándula.

La EQ no presenta ningún resultado analítico específico, un 30% de los pacientes presentan hipogammaglobulinemia y eosinofilia. La presencia de leucocitosis sugiere una sobreinfección del quiste. La afectación hepática puede verse reflejada en una elevación de las transaminasas, la bilirrubina o la fosfatasa alcalina, aunque de forma moderada.

La EQ tiene una distribución cosmopolita, el mayor número de casos humanos se sitúan en América del Sur, Norte y Este de África, Oriente Medio y países de Asia Central y del Oeste. En Europa, es especialmente prevalente en los países de la cuenca Mediterránea como Grecia, Italia, y Portugal. España es considerada como un área de alta endemicidad y el índice de transmisión continúa siendo elevado, aunque con desigual distribución geográfica entre las distintas Comunidades Autónomas. En la actualidad no existe consenso sobre cuál es el sistema idóneo de vigilancia epidemiológica de la EQ humana.

9.4.3 Diagnóstico de laboratorio

En 1985 se constituye el grupo informal de la OMS para el estudio de la equinococosis y en el año 2010 establece sus criterios diagnósticos. El diagnóstico de certeza es difícil de alcanzar y se determina por el hallazgo del parásito (protoescólex) en el examen microscópico del contenido del quiste o en la muestra histológica. De esta manera, en la práctica habitual el diagnóstico se basa fundamentalmente en tres pilares: i) las manifestaciones clínicas, ii) los análisis microbiológicos y iii) las técnicas de imagen.

9.4.3.1 Examen microscópico

En caso de que se obtengan muestras del quiste es aconsejable la realización de un examen directo al microscopio de las muestras obtenidas mediante aspiración del líquido del quiste. Se emplean diversas tinciones para determinar la presencia del parásito y su viabilidad. El líquido hidatídico se produce como respuesta biológica al aumento del número de escólex, es una sustancia compleja, transparente, producto del metabolismo del parásito. Presenta una densidad entre 1,007 a 1,012 y un pH de 7,4. El 98% corresponde a agua, sal, urea, ácido úrico, grasas y albumina. Además, posee propiedades antigénicas. En general los quistes activos son tensos mientras que los quistes rotos, degenerados o muertos son blandos. Los elementos microscópicos corresponden a las vesículas prolíferas, escólices y a los ganchos. Los elementos macroscópicos corres-

ponden a las vesículas hijas. Las vesículas prolíferas se forman por gemación de la membrana germinativa hacia el interior del quiste, miden 250 a 500 μm de diámetro y cada una suele contener 30 a 40 escólices. Al romperse estas vesículas liberan su contenido, formando la arenilla hidatídica, que vista al microscopio aparece compuesta por vesículas prolíferas, escólices y ganchos. Se calcula que un ml de arenilla corresponde a 400.000 escólices. Los escólices (protoescólices) son estructuras ovoideas de unos 200 μm de diámetro. En condiciones favorables los escólices se invaginan presentando las cuatro ventosas y la doble corona de ganchitos. Los escólex son los responsables de todas las manifestaciones clínicas de la EQ, incluyendo las recidivas. Crecen en la membrana laminar, flotan y se multiplican en el medio líquido. Al liberarse en el interior del quiste, se pueden implantar sobre casi cualquier superficie del organismo, y vuelven así a crear un nuevo quiste hidatídico. Se conoce como acefaloquistes o quistes estériles a las hidátides que no forman vesículas hijas ni escólices. Los ganchos son formaciones de 30 μm de longitud. Forman parte de la arenilla hidatídica y son de utilidad en el diagnóstico microscópico de la hidatidosis. Las vesículas hijas tienen la misma estructura que la hidátide madre, albugínea y germinativa, y si bien son capaces de reproducirse, la mayoría son infértiles. Pueden ser endógenas o exógenas, según logren desarrollarse hacia el interior o el exterior del quiste. Suelen aparecer en quistes de larga evolución (infrecuentes en pacientes pediátricos). El número de vesículas hijas por hidátide es variable y su tamaño puede llegar hasta 30 μm .

9.4.3.2 Técnicas serológicas

Los métodos serológicos son los análisis microbiológicos más empleados. Se utilizan fundamentalmente como apoyo al diagnóstico clínico y por imagen de la EQ, presentando resultados variables y algunas limitaciones. Hay que recordar que un resultado negativo no descarta la infección. Las técnicas clásicas que emplean el líquido hidatídico (LH) como fuente de antígeno están siendo reemplazadas progresivamente por el uso de antígenos purificados, recombinantes, y/o péptidos, en un intento de evitar los inconvenientes asociados al uso del LH, como la variabilidad en la sensibilidad en función de los sistemas de purificación, las fuentes de obtención (ovino, bovino, humano, etc.) y la escasa especificidad debida a las reacciones cruzadas con otros parásitos. Actualmente, se utilizan mayoritariamente derivados purificados o sintéticos de los dos antígenos principales de *E. granulosus*, Ag5 y AgB: i) Ag5 es una glicoproteína altamente inmunogénica y los recombinantes producidos hasta el momento actual (rAg5 y rAg5-38) presentan una antigenicidad reducida. Es por ello, que la mayoría de los nuevos tests que emplean este antígeno lo hacen en su forma nativa purificada. ii) AgB es una lipoproteína oligomérica termoestable formada por cinco subunidades AgB/1, EgAgB/2, EgAgB/3, EgAgB/4, EgAgB/5, de las cuales las cuatro primeras se expresan en metacestodos mientras que el AgB/5 solamente se expresa en el adulto. Además, muestra una expresión diferencial en humano y bovino, siendo el AgB/1 el que más se expresa en humanos. Las distintas subunidades presentan diferencias notables en su aplicación diagnóstica. La sensibilidad diagnóstica de las subunidades AgB/1, AgB/2 y AgB/4 son más altas (83,1%, 62,9% y 75,8%, respectivamente) que las obtenidas con las subunidades AgB/3 y AgB/5 (29,0% y 41,1%). Al comparar, mediante ELISA, seis recombinantes diferentes (dos derivados del AgB (AgB/1, AgB/2) y cuatro de otra naturaleza (EgCMDH, EgCaBP2, EgAFFPf, EgAFFPt), los recombinantes derivados del AgB mostraron los mejores resultados. En concreto, el rAgB/2 presenta los valores diagnósticos óptimos con una sensibilidad del 92,6% y una especificidad del 99,5% cuando la EQ se confirma quirúrgicamente, o con una sensibilidad del 73,2%, y una especificidad del 80,0% en pacientes con diagnóstico clínico. En otra evaluación reciente, ambos recombinantes (AgB/1 y AgB/2) mostraron sensibilidades similares en quistes activos-transicionales (85,1 % y 84,5 %, respectivamente) con variaciones en la especificidad (97,1 y 83,9 %). Además, el empleo de una construcción (Ag2B2t) que consiste en una repetición doble en tándem de la proteína original AgB/2 recombinante, mejora los valores diagnósticos del ensayo mediante ELISA, con una sensibilidad del 97,6%. Uno de los primeros ensayos rápidos, basados en una combinación de antígenos nativos crudos y parcialmente purificados fue un *Dot Immunogold Filtration Assay* (DIGFA). La técnica utiliza extractos de líquido hidatídico de *E. granulosus* (EgCF y AgB), extracto de protoescólices de *E. granulosus* (EgP) y un antígeno del metacestodo de *E. multilocularis* (Em2). La sensibilidad de este método fue mayor cuando se aplicaba en el diagnóstico hospitalario (93%) que en trabajos de campo (71,8%). El primer sistema de diagnóstico rápido en formato inmunocromatográfico (ICT) utilizaba LH como antígeno con una sensibilidad del 96,2%. Posteriormente, se han desarrollado otros ICT que utilizan una mezcla de AgB y Ag5 purificados (VIRapid® Hydatidosis, con sensibilidades del 69-74,1 % y especificidades del 96-100%), AgB recombinante (ADAMU-CE, sensibilidad 71,7%, especificidad 100%), o AgB1 recombinante (HYDrapid, sensibilidad 64%, especificidad 100%), con sensibilidades similares (a excepción del ADAMU-CE) a las obtenidas con un ELISA

comercial (RIDASCREEN®) y con mejora de la especificidad. Por tanto, las técnicas de diagnóstico rápido presentan una utilidad diagnóstica similar a las técnicas ELISA convencionales en el diagnóstico de EQ hepática. En general, las técnicas con antígenos recombinantes y antígenos purificados presentan alta especificidad con pacientes sanos y especificidad mucho mayor que aquellas que utilizaban LH en pacientes con otras parasitosis. Sin embargo, aún muestran reactividad cruzada en pacientes con equinococosis alveolar (EA) y cisticercosis. Además, independientemente del antígeno utilizado, y como norma, la sensibilidad de la técnica es mayor en los casos de quistes múltiples frente a los casos con un único quiste. Por último, todas las técnicas (tests convencionales y tests rápidos) presentan una sensibilidad diagnóstica baja en el caso de quistes inactivos.

9.4.3.3 Detección de ácidos nucleicos

Por último, el diagnóstico molecular mediante técnicas de amplificación genética, queda de momento, relegado a los centros de investigación y a algunos centros de tercer nivel. De esta manera, hay disponibles técnicas moleculares como la PCR y sus variantes (RT-PCR, q-PCR, LAMP, etc.), que permiten diferenciar molecularmente la EQ de la equinococosis alveolar (EA), así como el genotipado, si bien su aplicabilidad diagnóstica está restringida a pacientes sometidos a estrategias intervencionistas (cirugía o aspirado) donde el ADN se extrae de las muestras obtenidas. Se debería realizar caracterización molecular de los genotipos en humanos siempre que fuera posible. No sólo porque es fundamental para una correcta vigilancia epidemiológica, sino también por el tropismo diferente según los genotipos. Así, en un estudio en el que secuencian muestras clínicas, se indica que, aunque los genotipos más frecuentes en humanos (G1/G3, G6 y G7) se establecen fundamentalmente en el hígado, alguno de ellos presenta tendencias diferentes. Así, el genotipo G7 infecta casi exclusivamente el hígado (98,6%) mientras que el genotipo G1 combina la presentación hepática (54,6%) con la pulmonar en un porcentaje elevado de casos (19,6%). Por otro lado, el genotipo G6, además de infectar hígado (54,3%) y pulmones (25,7%), presenta un mayor tropismo por el sistema nervioso central (12,9%). El genotipado de los casos humanos es imprescindible en la estandarización y validación de las nuevas herramientas serológicas con antígenos recombinantes, ya que se sabe que algunos genotipos parasitarios no expresan algunas subunidades de ciertos antígenos. Por todo ello, es recomendable que independientemente de que exista un diagnóstico certero por otros métodos (pruebas de imagen y/o pruebas complementarias), tras la cirugía o aspirado, se realice siempre la caracterización molecular de los genotipos implicados a partir de las muestras clínicas extraídas. La aplicación de nuevas herramientas no invasivas y de fácil manejo abre nuevos caminos en el estudio de biomarcadores. Un ejemplo es el empleo de la prueba del aliento para el diagnóstico de la EQ. El análisis químico del aliento exhalado evidencia diferentes compuestos entre pacientes con EQ y EA y entre estos y controles sanos. Sin embargo, el ensayo no incluye pacientes con otras parasitosis u otras enfermedades en las que los niveles de estos compuestos podrían estar alterados, por lo que se necesitan estudios más amplios para determinar su aplicación clínica.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Akue JP, Eyang-Assengone ER, Dieki R. Loa loa infection detection using biomarkers: current perspectives. *Res Rep Trop Med*. 2018; 9:43-48.
2. Bangert M, Flores-Chávez MD, Llanes-Acevedo IP, Arcones C, Chicharro C, García E, et al. Validation of rK39 immunochromatographic test and direct agglutination test for the diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis in Spain. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018; 12(3): e0006277. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006277>
3. Basuni M, Muhi J, Othman N, Verweij JJ, Ahmad M, Miswan N, et al. A pentaplex real-time polymerase chain reaction assay for detection of four species of soiltransmitted helminths. *Am J Trop Med Hyg*. 2011; 84:338-43.
4. Belhassen-García M, Balboa Arregui Ó, Calabuig-Muñoz E, Carmena D, Esteban Velasco MDC, Fuentes Gago M, Fumado Pérez V, García Alonso J, García López Hortelano M, González Fernández LM, Herrero Martínez JM, Iglesias Iglesias MJ, Jiménez López M, López-Vélez R, Muñoz-Bellvis L, Muro A, Pardo-Lledías J, Peñaranda-Vera M, Perteguer-Prieto MJ, Picado A, Quiñones Sampedro JE, Rodríguez-Guardado A, Royo Crespo Í, Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Torrús Tendero D, Velasco Pelayo L. Executive summary of the consensus statement of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC), the Spanish Society of Tropical Medicine and International Health (SEM-TSI), the Spanish Association of Surgeons (AEC), the Spanish Society of Pneumology and Thoracic

- Surgery (SEPAR), the Spanish Society of Thoracic Surgery (SECT), the Spanish Society of Vascular and Interventional Radiology (SERVEI), and the Spanish Society of Paediatric Infectious Diseases (SEIP), on the management of cystic echinococcosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2020; 38:283-288. doi: 10.1016/j.eimc.2019.10.015.
5. Bisser S, Lumbala C, Nguertoum E, Kande V, Flevaud L, Vatunga G, et al. Sensitivity and specificity of a prototype rapid diagnostic test for the detection of *Trypanosoma brucei gambiense* infection: a multicentric prospective study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(4):e0004608. <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004608>
 6. Büscher P, Cecchi G, Jamonneau V, Priotto G. Human African trypanosomiasis. *Lancet*. 2017; 390:2397-2409.
 7. Cama VA, Mathison BA. Infections by intestinal coccidia and *Giardia duodenalis*. *Clin Lab Med* 2015; 35:423–444.
 8. Carlier Y, Altcheh J, Angheben A, Freilij H, Luquetti AO, Schijman AG, et al. Congenital Chagas disease: Updated recommendations for prevention, diagnosis, treatment, and follow-up of newborns and siblings, girls, women of childbearing age, and pregnant women. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019; 13(10):e0007694. <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0007694>
 9. Goterris L, Bocanegra C, Serre-Delcor N, Moure Z, Treviño B, Zarzuela F, et al. El cribado de las enfermedades parasitarias en la población inmigrante asintomática. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016; 34:25–31.
 10. Jourdan PM, Lamberton PHL, Fenwick A, Addiss DG. Soil-transmitted helminth infections. *Lancet*. 2018; 391:252-65.
 11. Levenhagen MA, Costa-Cruz JM. Update on immunologic and molecular diagnosis of human strongyloidiasis. *Acta Trop*. 2014;135:33-43.
 12. Llanes-Acevedo P. Aproximación a un sistema de vigilancia molecular de *Leishmania infantum* y sus vectores. Tesis de doctorado. 2018. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/49935/1/T40562.pdf>
 13. Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD. Chapter 2. Fasciola, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv Parasitol* 2009; 69:41.
 14. Mathison BA, Pritt BS. Update on malaria diagnostics and test utilization. *J Clin Microbiol*. 2017;55:2009-2017.
 15. Moore DA, McCroddan J, Dekumyoy P, Chiodini PL. Gnathostomiasis: an emerging imported disease. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9:647-650.
 16. Mukkala AN, Kwan J, Lau R, Harris D, Kain D, Boggild AK. An update on malaria rapid diagnostic tests. *Curr Infect Dis Rep*. 2018; 20(12):49.
 17. Nikolay B, Brooker SJ, Pullan RL. Sensitivity of diagnostic tests for human soil transmitted helminth infections: a meta-analysis in the absence of a true gold standard. *Int J Parasitol*. 2014; 44:765-74.
 18. Parrado R, Ramirez JC, de la Barra A, et al. Usefulness of serial blood sampling and PCR replicates for treatment monitoring of patients with chronic Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019; 63(2):e01191-18. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6355557/>
 19. 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.
 20. Saidin S, Othman N, Noordien R. Update on laboratory diagnosis of amoebiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019; 38:15–38.
 21. Ta-Tang TH, Crainey JL, Post RJ, Luz SL, Rubio JM. Mansonellosis: current perspectives. *Res Rep Trop Med*. 2018; 9:9-24.
 22. Unnasch TR, Golden A, Cama V, Cantey PT. Diagnostics for onchocerciasis in the era of elimination. *Int Health*. 2018;10 (suppl.1):i20-i26.
 23. Verweij JJ, Rune Stensvold C. Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. *Clin Microbiol Rev*. 2014; 27:371–418.
 24. WHO. Manual of basic techniques for a health laboratory. 2003.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Examen microscópico de sangre para detección de malaria	PNT-PI-01	
		Edición N° 2	Página 1 de 18

PNT-PI-01

Examen microscópico de sangre para detección de malaria

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2009	Edición inicial
02	2020	Segunda edición (actualización del PNT-PI-01 del Procedimiento SEIMC n° 35, publicado en 2009)

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Examen microscópico de sangre para detección de malaria	PNT-PI-01	
		Edición N° 02	Página 2 de 18

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir la forma realizar la tinción de Giemsa de sangre periférica para el diagnóstico de la infección por *Plasmodium*.

Es un documento de consulta para el personal de laboratorio encargado de su realización e interpretación

2. FUNDAMENTO

El método diagnóstico de elección ante la sospecha de una malaria es el examen microscópico de sangre venosa periférica teñida con Giemsa, que permite identificar la presencia de parásitos del género *Plasmodium* en sangre. También puede hacerse la tinción de sangre capilar, tejido placentario, médula ósea o tejido esplénico.

El colorante de Giemsa es una mezcla de pigmentos que tiñe las células hemáticas y algunos orgánulos parasitarios de forma que es posible distinguirlos (citoplasma azulado, cromatina rojiza). De esta forma se pueden reconocer y diferenciar las diferentes especies de *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*), *Babesia spp.*, *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei*, *T. rangelli*, *Toxoplasma spp.* y las diferentes filarias sanguíneas.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Alados Arboledas JC, Gómez García de la Pedrosa E, Leiva León J, Pérez Sáenz JL, Rojo Molinero E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. 10a. Pérez Sáenz JL (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2014.
Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia10a.pdf>
- García-Lechuz Moya JM, González López JJ, Orta Mira N, Sánchez Romero MI. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero MI (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017.
Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1b.pdf>
- Organización Mundial de la Salud. Métodos Básicos de Laboratorio en Parasitología Médica. 1992.
Disponible en: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/38858/9243544101_\(part1\).pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/38858/9243544101_(part1).pdf?sequence=1)
- DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. CDC. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dpdx/reference.html>
- Chiodini PL, Moody AH, Manser DW. Atlas of medical helminthology and protozoology. Fourth edition. 2001
- WHO. World Malaria Report 2018.

4. MUESTRAS

4.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Para la realización de esta técnica se requiere sangre periférica extraída en tubo con EDTA (de 5 o 10 ml) o heparina, o sangre capilar obtenida mediante punción del pulpejo del dedo.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Examen microscópico de sangre para detección de malaria	PNT-PI-01	
		Edición N°2	Página 3 de 18

También puede realizarse sobre tejido de placenta, biopsia esplénica o médula ósea remitidos en un frasco estéril con un poco de suero fisiológico o ya extendidos en un portaobjetos.

4.2. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

Se recomienda que las muestras se procesen lo antes posible tras la extracción para evitar que la morfología del parásito se altere, idealmente en los primeros 30 minutos desde la extracción de la muestra. Si no puede

4.3. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

La muestra será recepcionada en el área destinada a tal fin en el laboratorio, dónde se comprobarán los datos clínicos y epidemiológicos de interés diagnóstico. Toda sospecha de malaria se considerará urgente y se procesará lo antes posible.

Se deben de rechazar las muestras que se han dejado, a cualquier temperatura, durante un periodo superior a 8 horas desde su extracción.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Metanol.
- Colorante Giemsa.
- Agua destilada.
- Aceite de inmersión.
- Portaobjetos con borde esmerilado.

Los materiales empleados deben de estar limpios, pero no necesariamente estériles. Todos los materiales mencionados se conservan a temperatura ambiente.

6. APARATOS Y MATERIAL

- Microscopio
- Guantes de látex
- Probeta calibrada de 100 ml
- Pipetas Pasteur no estériles de 1 ml
- Portaobjetos, cubreobjetos y aceite de inmersión

7. PROCEDIMIENTO

- Ponerse guantes.
- Rotular los portaobjetos con el número de muestra.
- Preparar las extensiones lo antes posible desde la llegada de la muestra. De cada muestra deben de prepararse y teñir al menos dos gotas gruesas y dos extensiones finas. Conviene dejar hechas, pero sin teñir, un par de extensiones y de gotas gruesas por si hubiera que repetir las tinciones (ver anexo I).
- **Gota gruesa.** Depositar una pequeña **gota de sangre (5 µL)** en el centro de un portaobjetos y realizar círculos concéntricos con la punta de otro portaobjetos hasta dejar un círculo de aproximadamente 1,5-2 cm de diámetro con poco espesor de sangre (que se pueda leer a su través). Repetir el mismo procedimiento en otro portaobjetos.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Examen microscópico de sangre para detección de malaria	PNT-PI-01	
		Edición N° 2	Página 4 de 18

- **Extensión fina.** Depositar una pequeña **gota de sangre (5 µL)** en el extremo de un portaobjetos identificado con el número de muestra. Con el borde de otro portaobjetos distribuir la sangre y extenderla sobre la superficie para formar una película fina. Repetir el mismo procedimiento en otro portaobjetos.
- Dejar secar las gotas y las extensiones. **NO** fijar en placa. La gota gruesa debe dejarse secar durante al menos 30 minutos (poner los portaobjetos bajo la luz de una lámpara o del sol), para que no se desprenda al teñirla.
- **La extensión fina SE FIJA con metanol:** cubrir la extensión y dejar que se evapore el metanol. Así los hematíes se mantienen intactos y se ven las características diferenciales del hematíe y del parásito que ayudan a diferenciar la especie.
- **La gota gruesa NO SE FIJA**, así los hematíes se lisan por ósmosis y se ven los parásitos fuera de las células. Esto permite ver mayor cantidad de sangre que en la extensión fina.
- Preparar una dilución de Giemsa al 10% con agua destilada con un pH de alrededor de 7,2. Hacerlo cada vez que se vaya a teñir, no dejarlo preparado previamente porque el colorante precipita. Guardar el colorante en un lugar seco y oscuro.
- Para teñir 4 portaobjetos (dos gotas y dos extensiones): 18 ml de agua + 2 ml de Giemsa.
- Cubrir completamente los portaobjetos y dejar actuar **10 minutos**.
- Retirar el colorante con agua de manera suave (dejando resbalar el agua por detrás de los portaobjetos). Extremar las precauciones en la gota gruesa para evitar que la sangre se desprenda del cristal.
- Guardar la sangre que sobre en la nevera por si hubiera que realizar PCR de *Plasmodium* spp. u otras técnicas.
- Otras muestras: para las muestras que no sean sangre periférica, procesar y teñir como la extensión fina.
- Controles:
 - Controles externos: serán proporcionados por los diferentes programas de calidad a los que esté adscrito el laboratorio y se realizarán según las instrucciones de los mismos. Los resultados deben de ser supervisados por el responsable del área antes de que se emitan.
 - Controles internos: ocasionalmente se incluirán controles positivos que serán realizados de forma ciega como una muestra normal. Si se produce un falso negativo, será reexaminado para tratar de comprobar si se trata de un error en el procesamiento de la muestra o en su examen microscópico y se establecerán las medidas correctoras correspondientes.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

- Los portaobjetos teñidos con Giemsa se observarán al microscopio a 100X con aceite de inmersión. Es necesario ver un mínimo de 100 campos para dar un resultado negativo.
- Se verá primero la gota gruesa, si es negativa no es necesario ver las extensiones fina. Informar como negativo.
- Si la gota es positiva se observarán las extensiones para diferenciar las especies según sus características morfológicas (tamaño del hematíe, número de parásitos por hematíe, granulación, forma y tamaño de los trofozoítos, presencia de pigmento malárico, presencia y morfología de los distintos estadios parasitarios: trofozoítos, gametocitos, esquizontes (ver anexo II) y calcular el porcentaje de parasitemia si la especie es *P. falciparum*, según se indica en el anexo III. Informar como positivo, indicando el género y especie del parásito, así como el porcentaje de hematíes parasitados. Por ejemplo: "Se observa *Plasmodium falciparum*. Índice de parasitemia: 2,3%". Si la especie detectada no es *P. falciparum*, no es necesario calcular el índice de parasitemia.
- Si no se puede determinar con seguridad la especie, informar como *Plasmodium* spp. y realizar la PCR diferencial para confirmar la especie. Mientras tanto se indicará, apoyándose también en la técnica de

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Examen microscópico de sangre para detección de malaria	PNT-PI-01	
		Edición N°2	Página 5 de 18

detección de antígeno, si se puede o no excluir la infección por *P. falciparum* para dirigir el tratamiento, o, en su defecto se recomendará tratar como *P. falciparum* hasta que se confirme la especie.

- El facultativo responsable del área de parasitología comunicará los resultados telefónicamente al clínico solicitante en caso de que estos sean positivos. Los resultados serán registrados en el SIL por el facultativo o por el técnico.
- En las muestras rechazadas, se indicará la causa del rechazo: muestra no adecuada para el estudio solicitado, sangre coagulada, muestra derramada, etc.
- Conviene guardar una de las extensiones y de las gotas teñidas hasta que se haya supervisado el resultado definitivo por el responsable del área de parasitología. Eliminar el resto de los portaobjetos en un contenedor adecuado. Apagar, limpiar y cubrir el microscopio. Limpiar la zona de trabajo.

9. RESPONSABILIDADES

- Es responsabilidad del equipo de atención al paciente la sospecha de la infección o la realización de los protocolos de screening de la infección si corresponde en la situación, así como la correcta realización de la petición de la prueba, y la recogida, identificación y envío de la muestra.
- Es responsabilidad del área de recepción de muestras:
Informar sobre cómo deben de recogerse y enviarse las muestras al Servicio de Microbiología.
El rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas y la adopción de las correspondientes medidas correctoras.
La recepción de la muestra correctamente identificada.
Avisar inmediatamente al área de parasitología cuando se reciba la muestra para su procesamiento inmediato.
- Es responsabilidad del personal de secretaría la correcta transcripción de la información que manejen y de mantener su confidencialidad.
- Es responsabilidad del área de gestión de calidad la recepción y distribución de los controles de calidad externos.
- Es responsabilidad del técnico del área de parasitología:
El procesamiento de la muestra y la realización de las extensiones.
La preparación de los reactivos, el control de los productos almacenados y la solicitud de material fungible con la antelación adecuada.
- Es responsabilidad del responsable del área de parasitología:
La visualización e interpretación de las extensiones.
La emisión y validación de los resultados.
La investigación de las causas de error y la adopción de medidas correctoras.
- Las solicitudes urgentes durante las guardias se atenderán siguiendo los procedimientos previstos para estas situaciones. El responsable del área de parasitología revisará los resultados emitidos durante la guardia.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Reconocimiento de la especie de *Plasmodium* y posibles causas de error:

- Reconocer los diferentes estadios de *Plasmodium* y discriminar entre las diferentes especies requiere cierta experiencia. Las infecciones mixtas por más de una especie no son excepcionales en ciertas zonas geográficas y pueden ser difíciles de reconocer. La realización de las técnicas de detección de antígeno puede ayudar a confirmar la presencia de *P. falciparum* y la PCR a confirmar la presencia de infecciones mixtas o infecciones por especies no falciparum.
- Si no fuese posible identificar la especie, se deberá recomendar realizar tratamiento como si fuese

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Examen microscópico de sangre para detección de malaria	PNT-PI-01	
		Edición N°2	Página 6 de 18

P. falciparum hasta que se pueda confirmar la especie.

- La incorrecta realización de la tinción o la tinción por otros métodos, pueden inducir a error si, por ejemplo, no se tiñen correctamente las granulaciones intraeritrocitarias. La tinción de Field es una alternativa útil a la tinción de Giemsa.
- Las plaquetas superpuestas a los hematíes pueden dar lugar a imágenes dudosas y a veces es difícil diferenciarlas de los gránulos de cromatina.
- La presencia de parásitos intraeritrocitarios puede confundirse con *Babesia* spp. En esta enfermedad no se observan gametocitos ni pigmento malárico, y los datos epidemiológicos suelen ayudar a su diferenciación.

Tiempo de entrega de muestras urgentes:

- Toda sospecha de malaria o petición de gota gruesa se considerará urgente y se procesará como tal. Los resultados preliminares se comunicarán por teléfono al médico responsable del paciente y por el SIL.
- Todo el proceso puede realizarse en un tiempo aproximado de 2 horas.

11. LIMITACIONES AL PROCEDIMIENTO

- Si la prueba es negativa, ante una historia clínica y antecedentes epidemiológicos compatibles con malaria, se deben de solicitar hasta 3 muestras diferentes para gota gruesa en un periodo de 12 o 24 horas para descartar la infección.
- En algunas malarías graves el secuestro capilar de hematíes parasitados puede ser causa de falsos negativos y los pacientes que han vivido en zonas endémicas durante varios años poseen cierta semiinmunidad que puede hacer que los parásitos no sean detectados por microscopía. La PCR sí es capaz de detectar estas parasitemias submicroscópicas.
- La toma de antimaláricos como profilaxis o tratamientos previos y la de algunos antibióticos como las quinolonas o las tetraciclinas, pueden enmascarar una malaria negativizando temporalmente la gota gruesa.

12. BIBLIOGRAFÍA

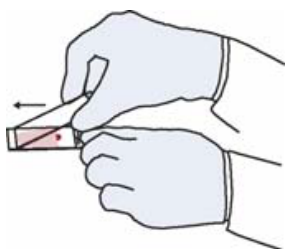
1. Krampa FD, Aniweh Y, Awandare GA, Kanyong P. Recent progress in the development of diagnostic tests for malaria. *Diagnostics (Basel)* 2017; 7(3):54.
2. Martín-Díaz A, Rubio JM, Herrero-Martínez JM, et al. Study of the diagnostic accuracy of microbiological techniques in the diagnosis of malaria in the immigrant population in Madrid. *Malar J.* 2018; 17:314.
3. Mathison BA, Pritt BS. Update on malaria diagnostics and test utilization. *J Clin Microbiol.* 2017; 55:2009-17.
4. Mukkala AN, Kwan J, Lau R, Harris D, Kain D, Boggild AK. An update on malaria rapid diagnostic tests. *Curr Infect Dis Rep.* 2018; 20(12):49
5. Muñoz J, Rojo-Marcos G, Ramírez-Olivencia G, et al. Diagnóstico y tratamiento de la malaria importada en España: recomendaciones del Grupo de Trabajo de Malaria de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEMTSI). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015;33: e1–e13.
6. Talapko J, Škrlec I, Alebic T, Juki M, Vcev A. Malaria: the past and the present. *Microorganisms* 2019; 7(6):179.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Examen microscópico de sangre para detección de malaria	PNT-PI-01	
		Edición N°2	Página 7 de 18

ANEXO I. ESQUEMA PARA LA REALIZACIÓN DE LAS TINCCIONES DE LA GOTA GRUESA Y EL FROTIS SANGUÍNEO.

EXTENSIÓN FINA:

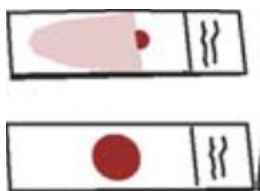
- Colocar con una pipeta 5 µl de sangre total con EDTA en el extremo de una porta identificado con el número de muestra.
- Extender la sangre con la arista de otro portaobjetos con un ángulo aproximado de 45°.



- Repetir el mismo procedimiento con otro portaobjetos.
- Dejar secar completamente la muestra al aire.
- Fijar con metanol al 100%: cubrirlo, desechar el exceso y dejar que se evapore.

GOTA GRUESA:

- Colocar con una pipeta 5 µl de sangre total con EDTA en el centro de un portaobjetos.
- Repetir el mismo procedimiento con otro portaobjetos.
- Hacer círculos concéntricos con la esquina de otro portaobjetos hasta que quede una gota homogénea y no muy gruesa, que se pueda leer a su través.
- NO fijar, dejar secar al aire bien (se pueden poner debajo de una lámpara, pero no sobre una placa calefactora)



TINCIÓN DE GIEMSA: Se utiliza para teñir hemoparásitos: *Plasmodium* spp., *Babesia* spp., *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp.

- Preparar la dilución del Giemsa al 10%: 18 ml de agua destilada+ 2 ml de Giemsa
- Cubrir los 4 portaobjetos y dejar 10 minutos.
- Lavar con mucho cuidado las gotas (al no estar fijadas se pueden ir con el chorro del agua).
- Dejar secar y ver al microscopio (100X).

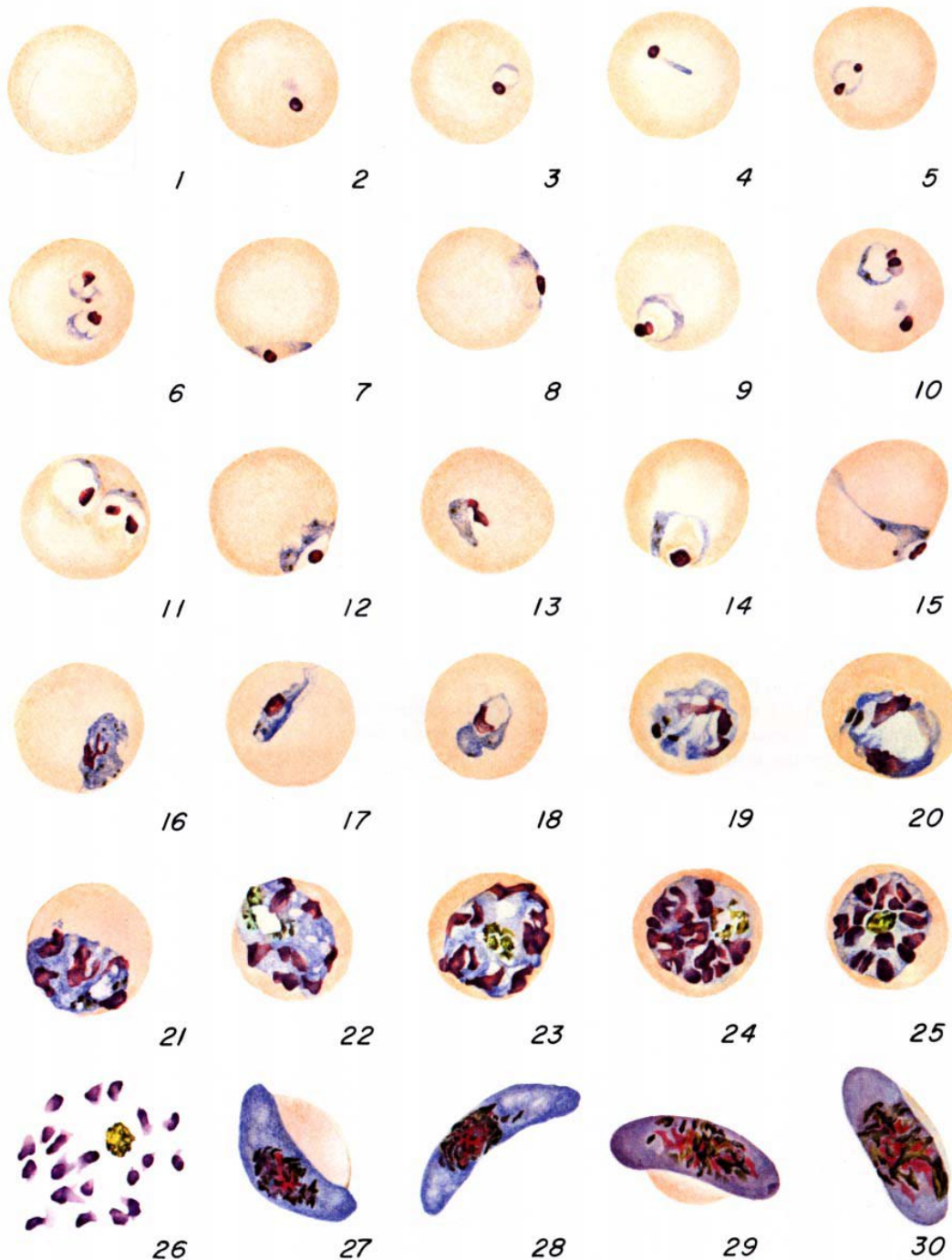
Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Examen microscópico de sangre para detección de malaria	PNT-PI-01	
		Edición N°2	Página 8 de 18

ANEXO II. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE *Plasmodium*

Características diferenciales de cada especie:

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>
Tamaño del eritrocito	No agrandado	No agrandado o más pequeño	Más grande	Más grande
Forma del eritrocito	Redondo	Redondo	Redondo	Ovalado, con borde deflecado
Color del eritrocito	Normal	Normal	Pálido	Pálido
Punteado	Grietas de Maurer (puntos rojos y grandes), sólo en trofozoitos maduros	Raramente y difíciles de ver (puntos de Ziemann)	Punteado de Schüffner (muchos y pequeños)	Punteado de Schüffner (muchos y pequeños)
Trofozoito joven	Anillo fino, delgado, dos puntos de cromatina, formas accolé	Compacto, cromatina grande, a veces en el centro del citoplasma.	Ameboide, citoplasma grande	Citoplasma grande, a veces con prolongaciones, cromatina gruesa
Trofozoito maduro	Citoplasma más compacto, hemozoina oscura. Raros en sangre periférica	Formas en banda, citoplasma más compacto y cromatina más grande	Ameboide, citoplasma grande, hemozoina amarillenta	Citoplasma grande, ameboide, hemozoina amarillenta
Esquizonte	De 16 a 24 merozoítos, no suelen verse en sangre periférica	De 6 a 12 merozoítos con núcleo grande rodeando un pigmento de hemozoina oscura	De 14 a 24 merozoítos, llenando casi todo el hematíe	De 6 a 12 merozoítos, hemozoina
Gametocito	Forma de banana	Redondo y compacto, ocupa todo el hematíe. Hemozoina dispersa	Redondo y compacto. Ocupa casi todo el eritrocito.	Redondo y compacto, abundante punteado en la periferia

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Examen microscópico de sangre para detección de malaria	PNT-PI-01	
		Edición N°2	Página 9 de 18

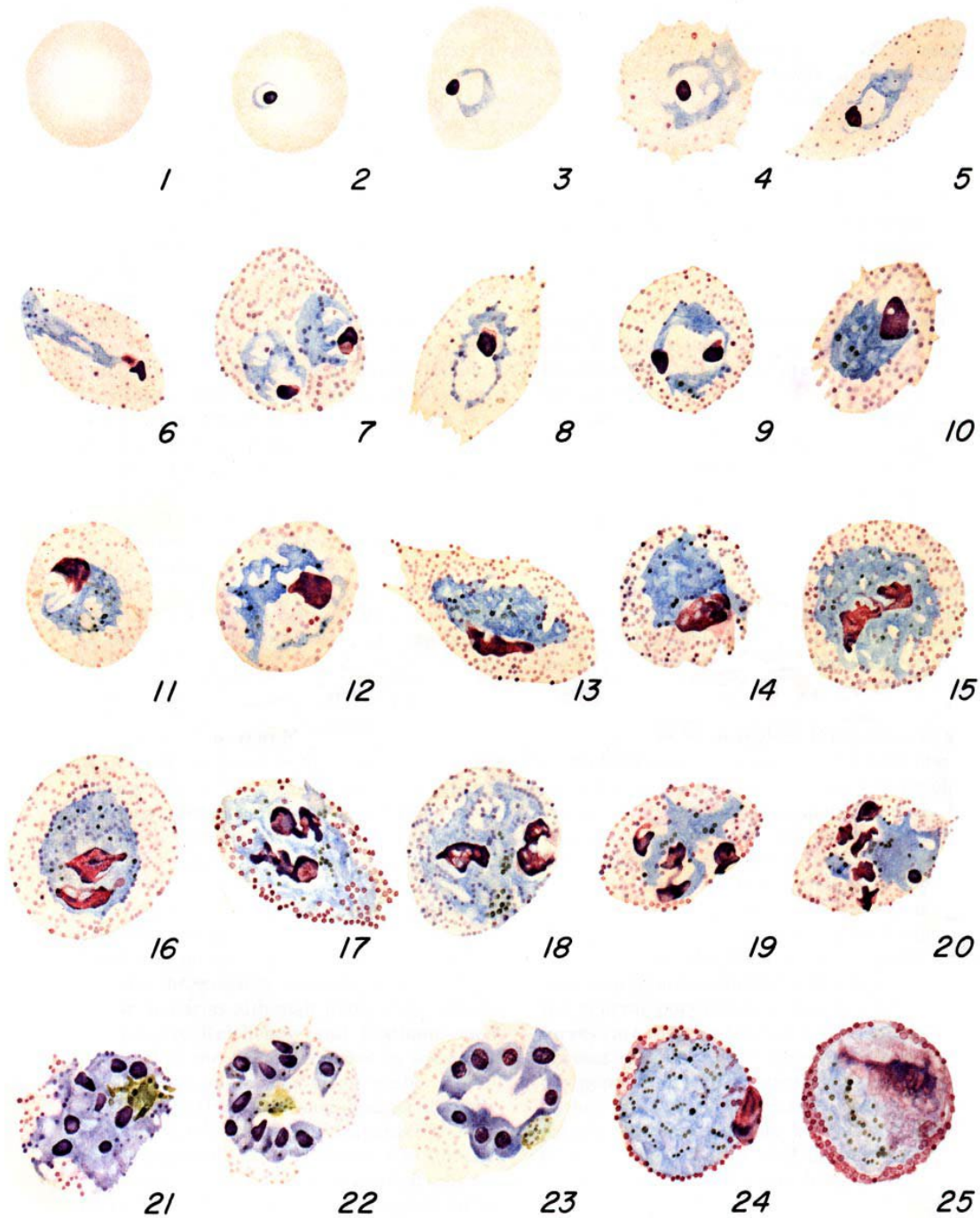


0 10 μ

PLASMODIUM FALCIPARUM

J.H. Nicholson

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Examen microscópico de sangre para detección de malaria	PNT-PI-01	
		Edición N°2	Página 10 de 18

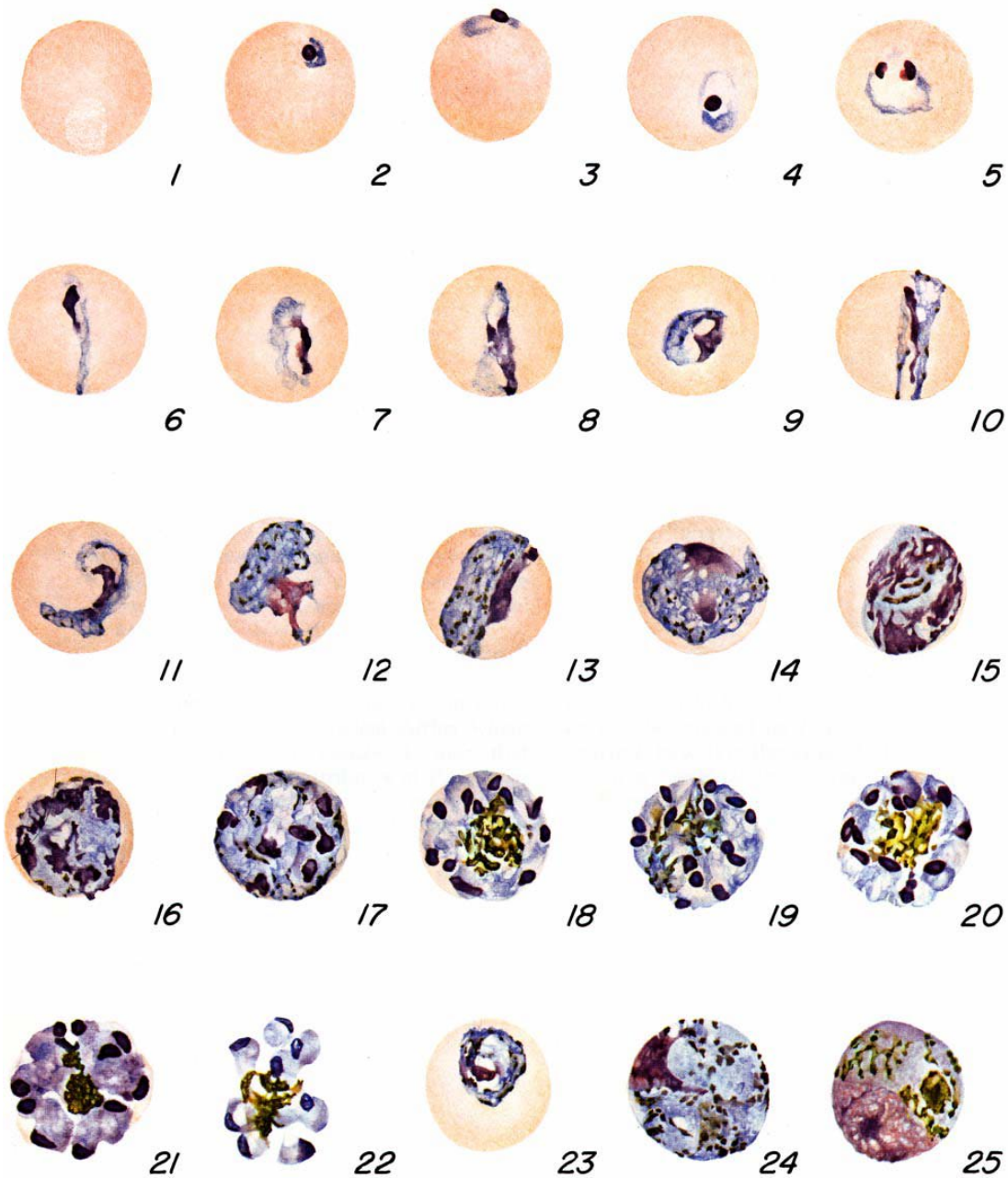


0 10 μ

PLASMODIUM OVALE

P. H. Nicholson

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Examen microscópico de sangre para detección de malaria	PNT-PI-01	
		Edición N°2	Página 11 de 18

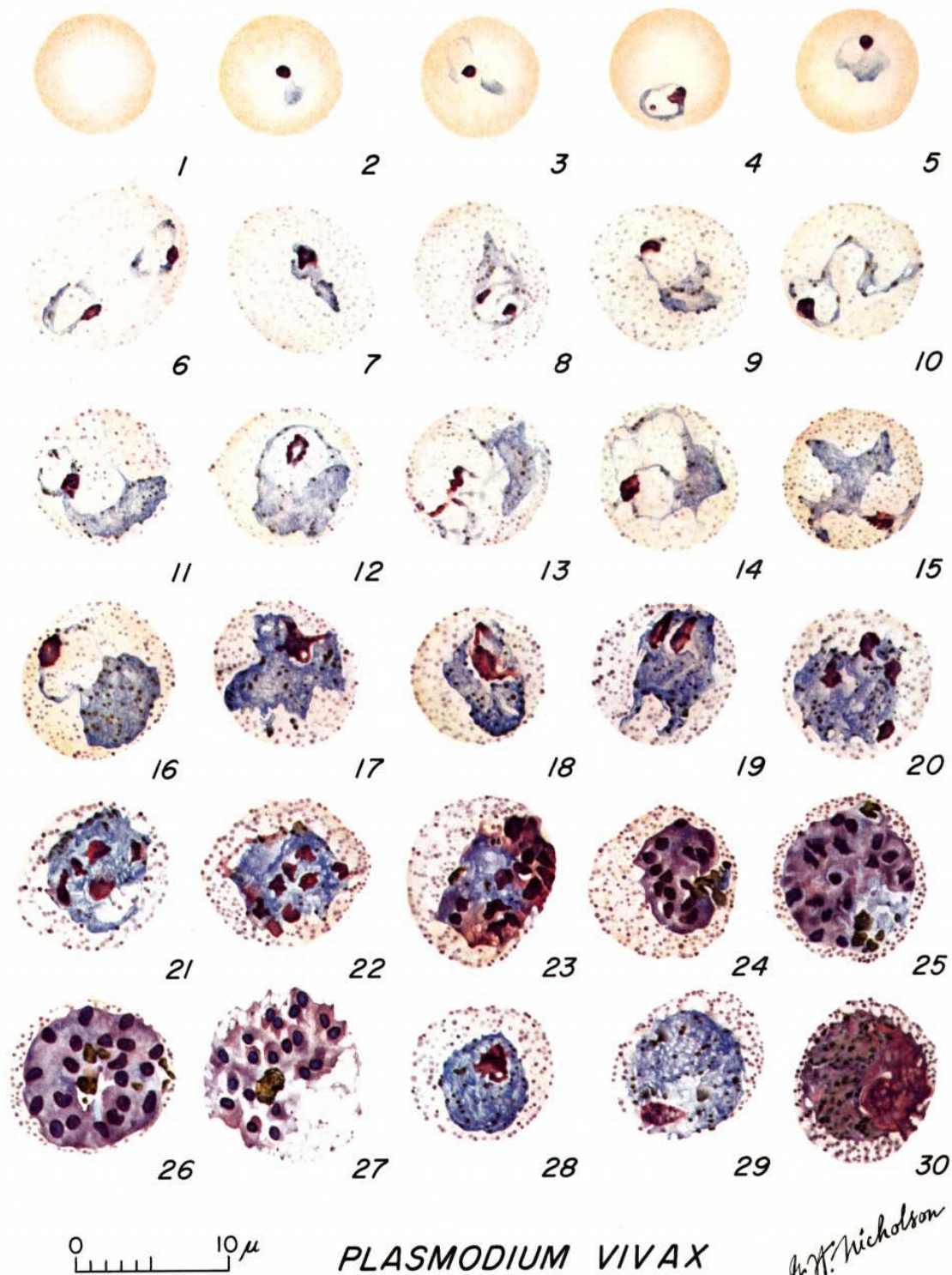


0 10μ

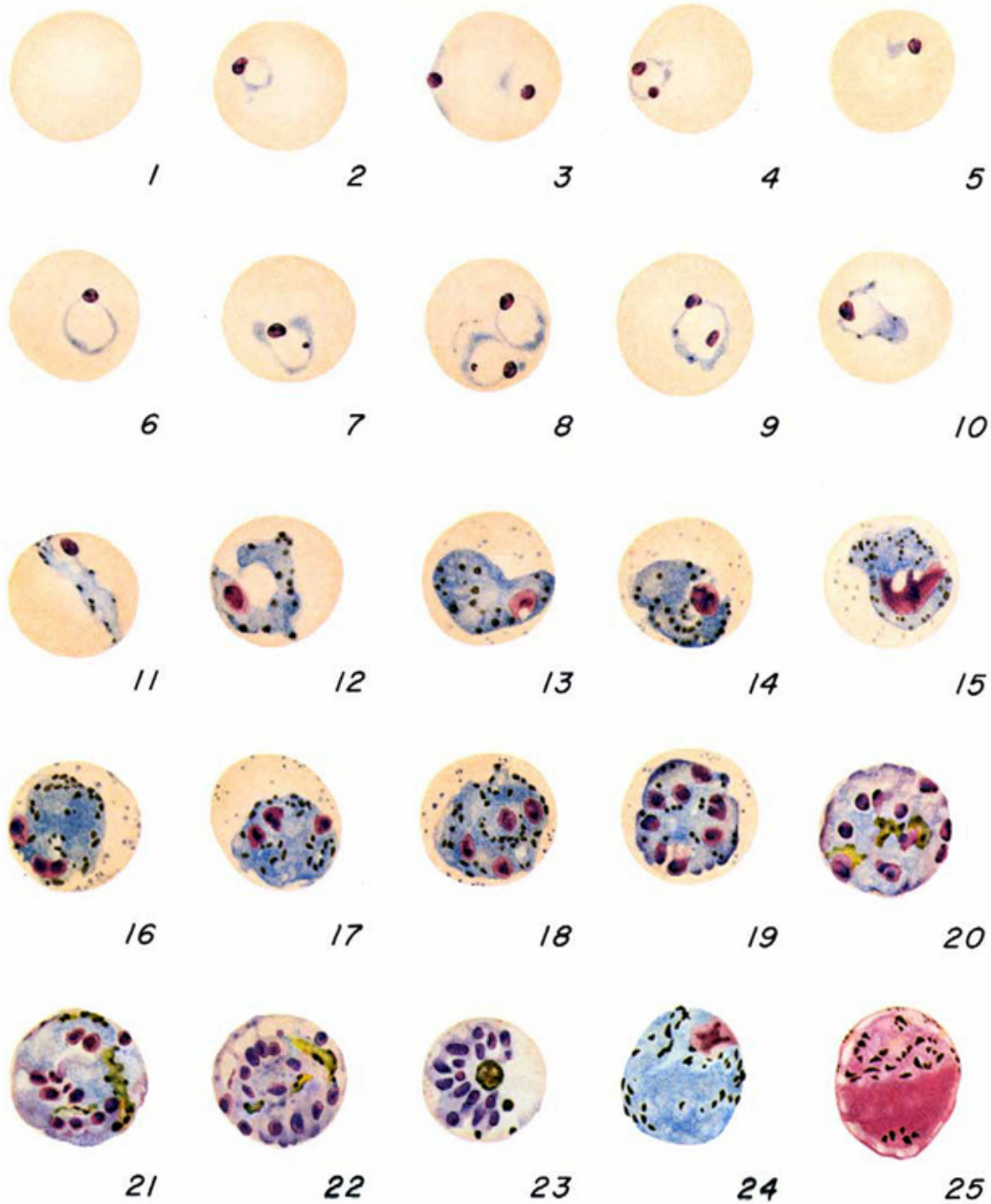
PLASMODIUM MALARIAE

H. H. Nicholson

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Examen microscópico de sangre para detección de malaria	PNT-PI-01	
		Edición N°2	Página 12 de 18



Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Examen microscópico de sangre para detección de malaria	PNT-PI-01	
		Edición N°2	Página 13 de 18

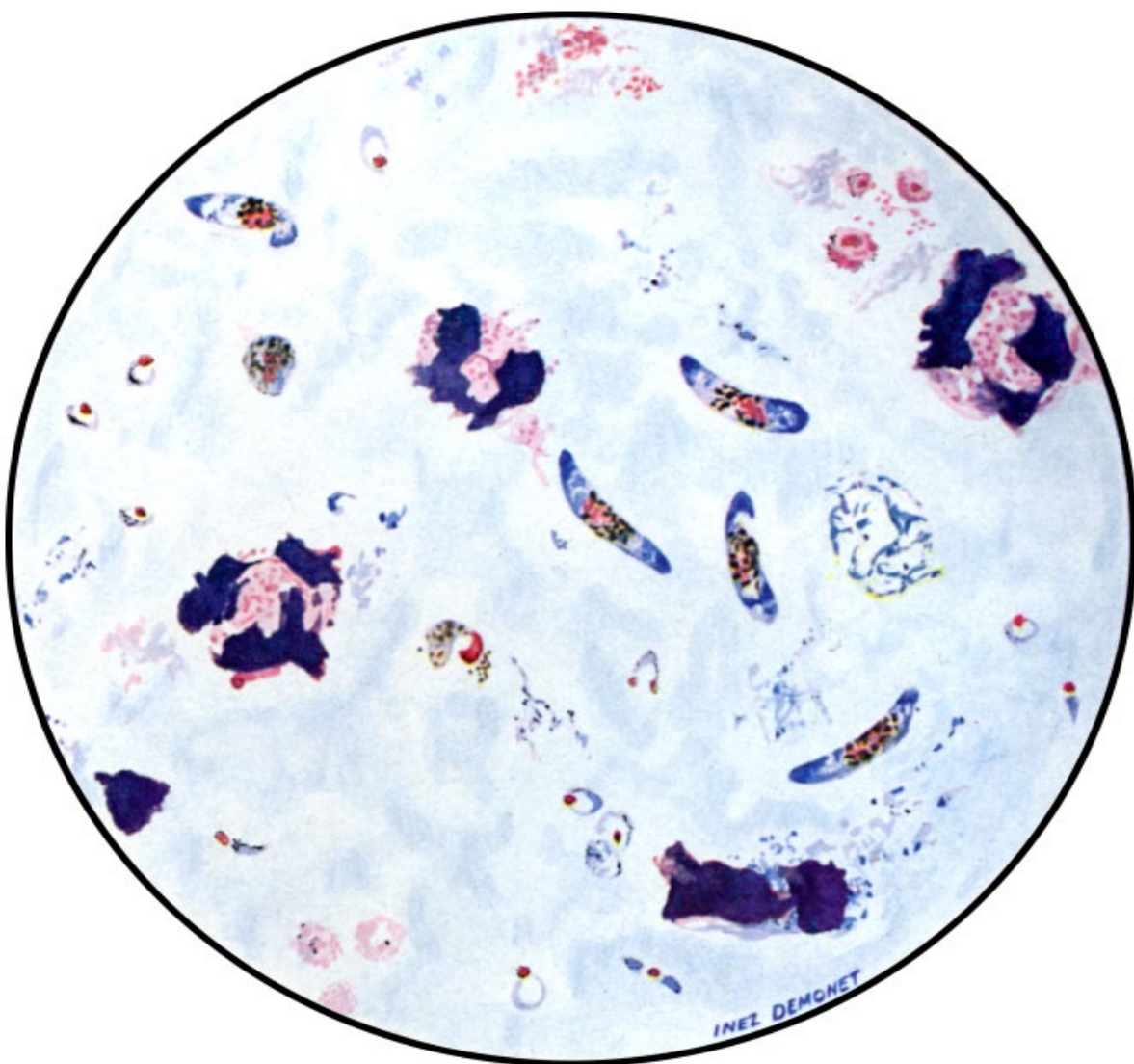


S.H. Nicholson

PLASMODIUM KNOWLESI

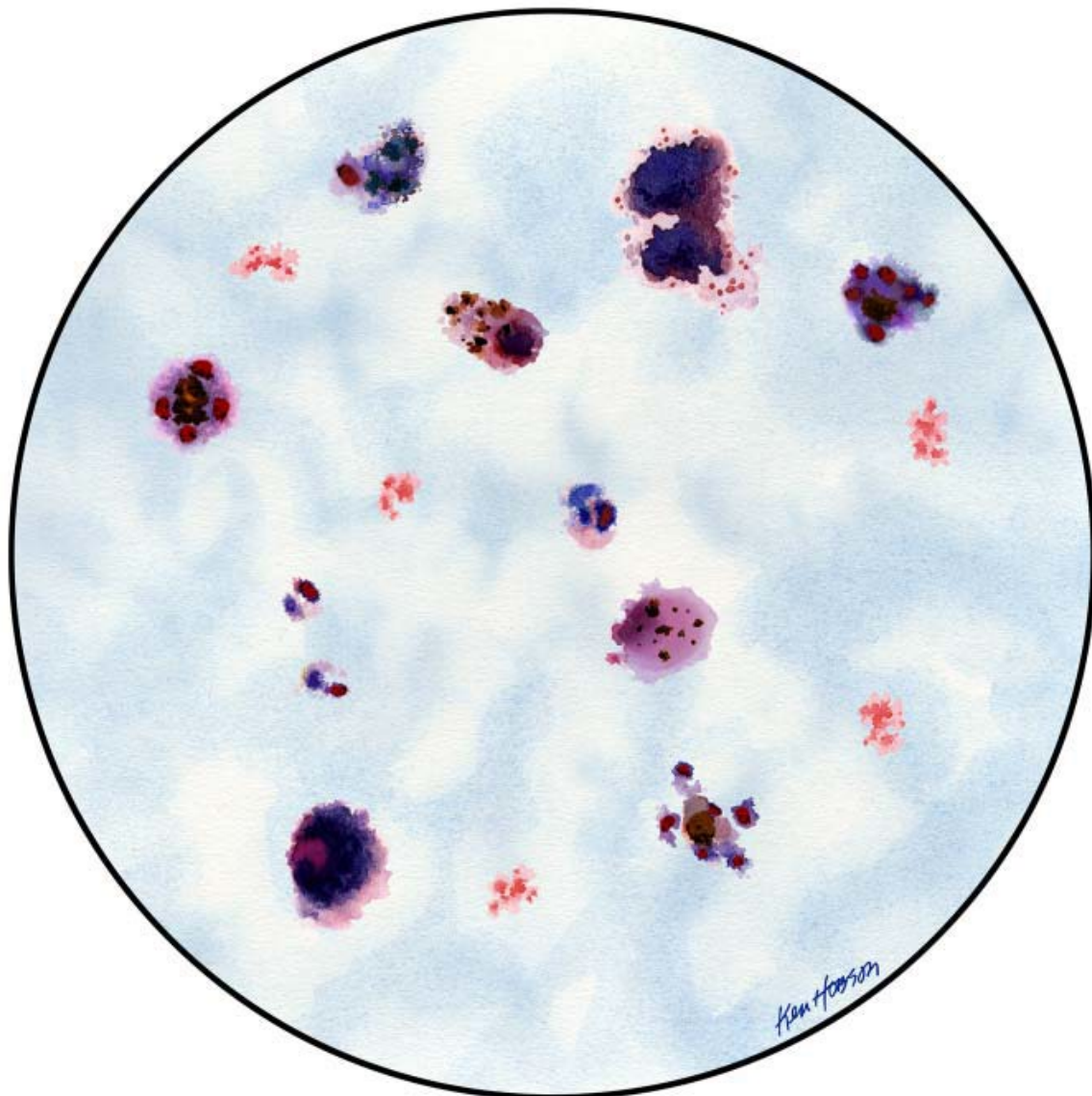
Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Examen microscópico de sangre para detección de malaria	PNT-PI-01	
		Edición N°2	Página 14 de 18

***P. falciparum* en la GOTA GRUESA**



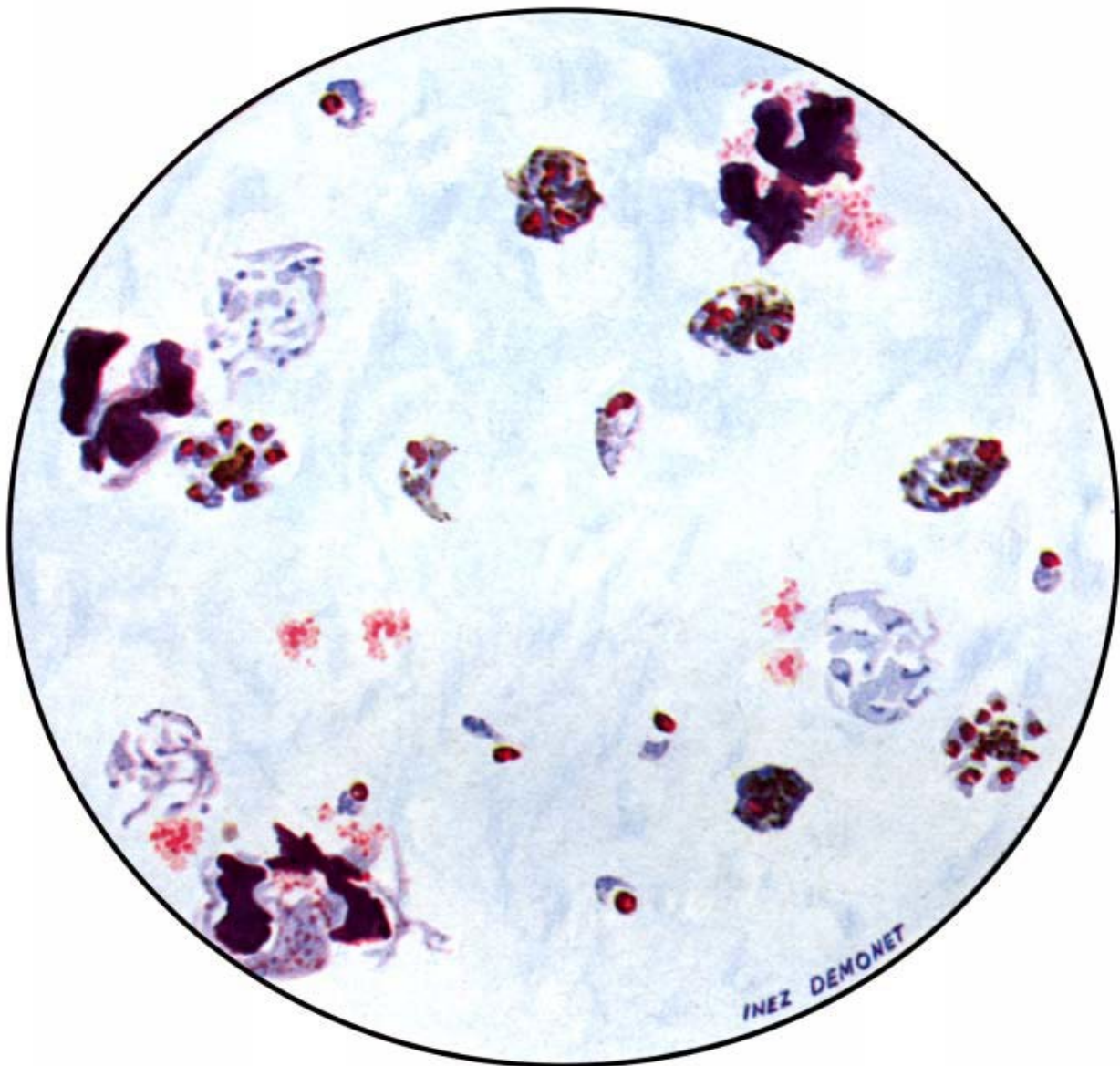
Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Examen microscópico de sangre para detección de malaria	PNT-PI-01	
		Edición N°2	Página 15 de 18

***P. ovale* en la GOTA GRUESA**



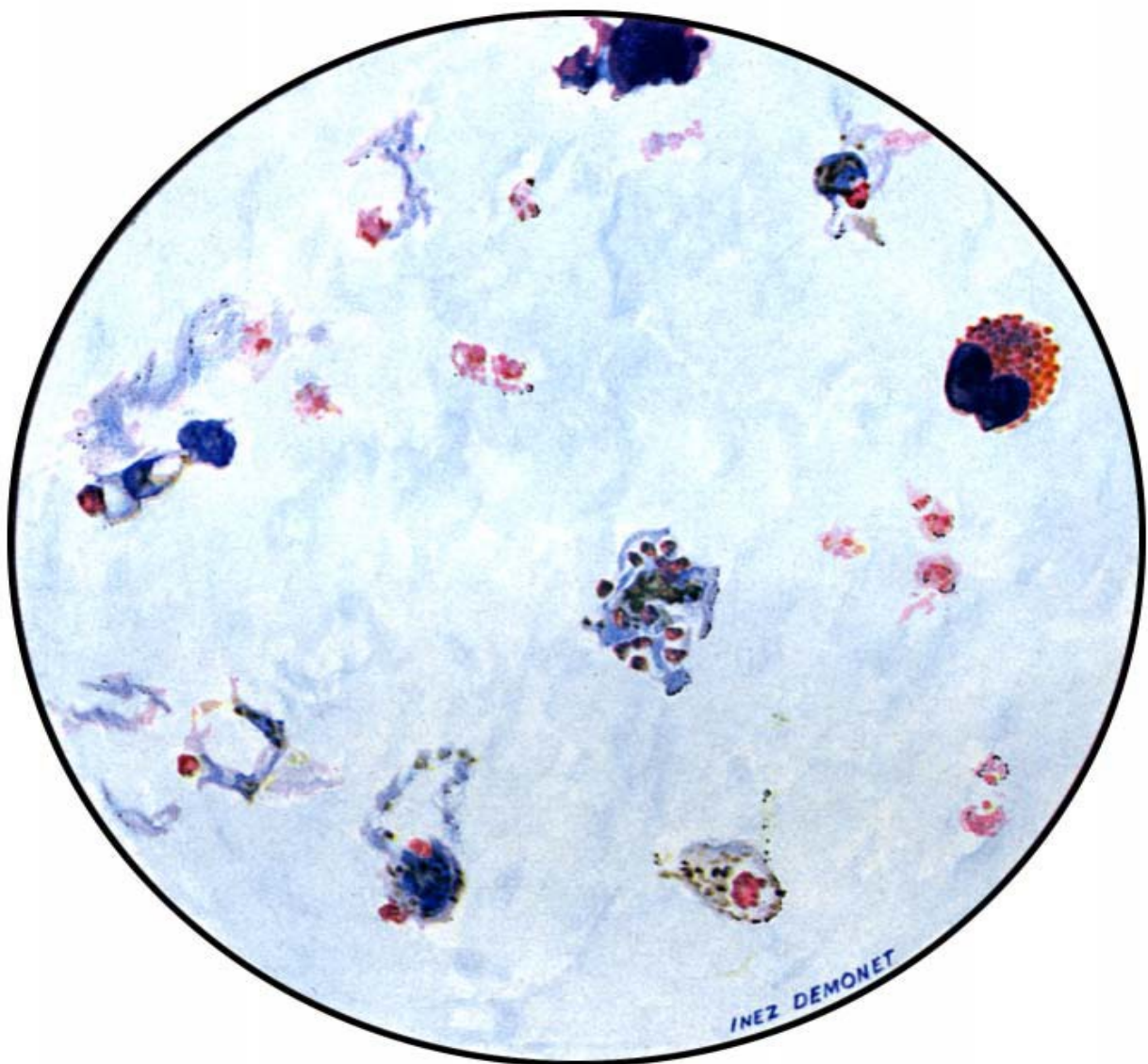
Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Examen microscópico de sangre para detección de malaria	PNT-PI-01	
		Edición N°2	Página 16 de 18

***P. malariae* en la GOTA GRUESA**



Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Examen microscópico de sangre para detección de malaria	PNT-PI-01	
		Edición N°2	Página 17 de 18

***P. vivax* en la GOTA GRUESA**



Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Examen microscópico de sangre para detección de malaria	PNT-PI-01	
		Edición N°2	Página 18 de 18

ANEXO III. CÁLCULO DE PARASITEMIA

FROTIS:

- En el frotis se calcula el porcentaje de hematíes parasitados.
- Ir a un campo donde los hematíes se toquen sin superponerse y estén bien teñidos. Se estima que en cada campo de estas características hay unos 250 hematíes.
- Contar el número de hematíes infectados en 8 campos. (Contar el número de células parasitadas, no el número de parásitos en cada célula)
- Contar sólo los hematíes parasitados por estadíos asexuales del parásito. Los gametocitos no se cuentan ya que no producen clínica en el paciente y no pueden continuar el ciclo en el ser humano.
- Calcular:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ hematíes parasitados} / 8 \text{ campos} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ células (250X8)}} = \frac{\text{n}^\circ \text{ hematíes parasitados}}{20} = \text{parasitemia (\%)}$$

GOTA GRUESA:

- En la gota gruesa se determinará el número de parásitos por microlitro de sangre.
- Elegir una zona de la gota gruesa donde los parásitos estén bien teñidos y los leucocitos estén distribuidos de forma homogénea.
- Contar el número de parásitos y el número de leucocitos en cada campo hasta que se llegue a 200 leucocitos y hacer el cálculo con el número de leucocitos que tiene el paciente, si se conoce y si no calcular con un número medio estimado de 8.000 por microlitro de sangre.

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ parásitos} \times 8000 \text{ leucocitos}}{200 \text{ leucocitos}} = \text{n}^\circ \text{ parásitos} \times 40 = \text{n}^\circ \text{ parásitos por microlitro de sangre}$$

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de antígenos de <i>Plasmodium</i> spp.	PNT-PI-02	
		Edición N° 2	Página 1 de 7

PNT-PI-02

Detección de antígenos de *Plasmodium* spp.

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2009	Edición inicial
02	2020	Segunda edición (actualización del PNT-PI-02 del Procedimiento SEIMC n° 35, publicado en 2009)

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de antígenos de <i>Plasmodium</i> spp.	PNT-PI-02	
		Edición N° 02	Página 2 de 7

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

- El objetivo de este documento es describir la forma de realizar uno de los tests inmunocromatográficos rápidos (RDT: rapid diagnostic test) actualmente comercializados para la detección de antígenos de *Plasmodium* spp.
- Existen muchos más tests comercializados que pueden consultarse en la página web de la OMS.
- Es un documento de consulta para el personal del laboratorio encargado de su realización e interpretación.

2. FUNDAMENTO

- El diagnóstico de malaria se realiza mediante el estudio de sangre periférica, donde se buscan los protozoos del género *Plasmodium*. La técnica de elección es la visualización microscópica tras la tinción con Giemsa de la muestra, pero existen también técnicas de detección de antígeno que son ampliamente usadas.
- Esta prueba de diagnóstico rápido detecta un antígeno específico de *P. falciparum* [proteína rica en histidina II (HRP-2)] y un antígeno panmalárico (aldolasa), común a todas las especies de *Plasmodium*, que están presentes en la sangre si un paciente está infectado por este parásito.
- Es un test rápido de inmunocromatografía para la detección cualitativa de antígenos de *Plasmodium* spp. en sangre. Es útil como ayuda al examen microscópico en el diagnóstico diferencial de *P. falciparum* de otras especies de *Plasmodium*, pero la identificación definitiva a nivel de especie debe de realizarse mediante la tinción de Giemsa del frotis sanguíneo y/o mediante PCR específica.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Alados Arboledas JC, Gómez García de la Pedrosa E, Leiva León J, Pérez Sáenz JL, Rojo Molinero E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. 10a. Pérez Sáenz JL (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2014.
Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia10a.pdf>
- García-Lechuz Moya JM, González López JJ, Orta Mira N, Sánchez Romero MI. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero MI (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017.
Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1b.pdf>
- Organización Mundial de la Salud. Métodos Básicos de Laboratorio en Parasitología Médica. 1992.
Disponible en: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/38858/9243544101_\(part1\).pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/38858/9243544101_(part1).pdf?sequence=1)
- DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. CDC. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dpdx/reference.html>
- Chiodini PL, Moody AH, Manser DW. Atlas of medical helminthology and protozoology. Fourth edition. 2001
- WHO. World Malaria Report 2018.
- Prospecto con las instrucciones del fabricante presente en la caja de reactivos.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de antígenos de <i>Plasmodium</i> spp.	PNT-PI-02	
		Edición N° 02	Página 3 de 7

4. MUESTRAS

- Para la realización de esta técnica se requiere muestra de sangre periférica extraída en tubo con EDTA (de 5 o 10 ml) o heparina, o sangre capilar obtenida mediante punción del pulpejo del dedo.
- La muestra será recepcionada en el área destinada a tal fin en el laboratorio, donde se comprobarán los datos clínicos y epidemiológicos de interés diagnóstico. Toda sospecha de malaria se considerará urgente y se procesará lo antes posible.
- Si la muestra no es analizada inmediatamente se debe refrigerar a 2-8°C y utilizarse en los siguientes 3 días como máximo.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Reactivos y productos:

- Tarjeta de reacción
- Envase de goteo con diluyente (reactivo A).

Conservación y fecha de caducidad:

- La caja de reactivos se conservará en nevera hasta que se abra la primera tarjeta. Luego puede mantenerse entre 2 y 37°C.
- En general no se usarán reactivos para inmunodiagnóstico después de su fecha de caducidad. Si, de forma excepcional, no se dispusiera de reactivos no caducados, se podrán utilizar los caducados como complemento al examen microscópico durante el mes siguiente a la caducidad, pero no se podrá informar de su resultado.
- Ningún material continuará usándose cuando se observen signos de deterioro.

6. APARATOS Y MATERIAL

- Guantes.
- Pipeta de 20 µl.
- Ninguno adicional salvo los incluidos en el *kit*.

7. PROCEDIMIENTO

- Retirar el dispositivo de la bolsa y ubicar sobre una superficie plana y seca. Marcarla con el número de muestra y la fecha.
- Dejar que el reactivo A se atempere, si estaba en nevera.
- Homogeneizar bien la muestra.
- Añadir lentamente 15 µl de sangre con una pipeta en la mitad inferior de la almohadilla de muestra morada.
- Añadir 2 gotas del reactivo A en la almohadilla blanca que hay inmediatamente por debajo de la morada. NO añadir el reactivo A sobre la almohadilla morada.
- Dejar que la muestra de sangre recorra la longitud total de la tira reactiva sin dejar que la sangre llegue al interior de la almohadilla superior. Si al cabo de 1 minuto la sangre no sigue subiendo hacia la almohadilla superior añadir una gota adicional del reactivo A en la almohadilla blanca inferior.
- Cuando la sangre llegue a la almohadilla superior añadir lentamente 4 gotas del reactivo A en la almohadilla de lavado de la parte superior izquierda del dispositivo, dejando que se absorba cada gota antes de

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de antígenos de <i>Plasmodium</i> spp.	PNT-PI-02	
		Edición N° 02	Página 4 de 7

añadir la siguiente.

- Quitar el adhesivo de la parte izquierda del dispositivo y cerrar el dispositivo.
- Leer el resultado a los 15 minutos de haber cerrado el dispositivo.

Controles:

Controles externos: serán proporcionados por los diferentes programas de calidad a los que esté adscrito el laboratorio y se realizarán según las instrucciones de los mismos. Deberían de hacerse cada vez que se abra una nueva caja. Los resultados deben de ser supervisados por el responsable del área antes de que se emitan.

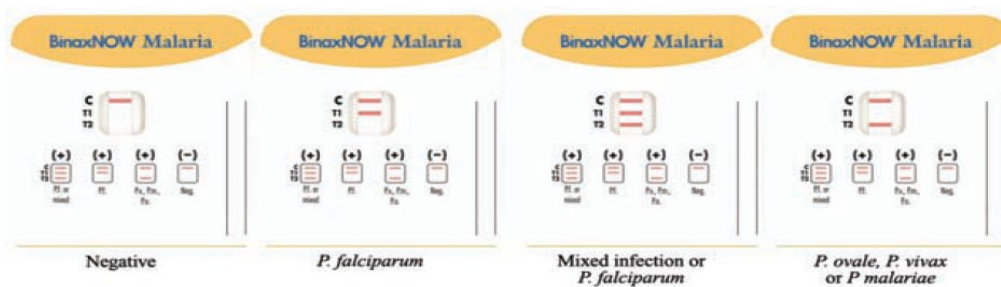
Controles internos: la caja de reactivos no incluye muestras de control. Se realizarán alícuotas de muestras positivas que se vayan teniendo y se congelarán para poder utilizarlas como control cuando se produzcan resultados discrepantes.

Periódicamente, los responsables de Calidad incluirán controles positivos abiertos y ciegos para el personal que realiza el procedimiento. Cada vez que se produzca un fallo en un control, este será reexaminado para tratar de comprobar si se trata de un error del procesamiento de la muestra o del examen microscópico y se establecerán las medidas correctas correspondientes.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

En las figuras 1 y 2 se presentan los posibles resultados que se pueden obtener al utilizar un test rápido para el diagnóstico de malaria.

Figura 1. Posibles resultados del test diagnóstico rápido de malaria BinaxNow-ICT.



Modificado de: Stauffer W, et al. Diagnostic performance of rapid diagnostic test versus blood smears for malaria in US clinical practice. Clin. Infect Dis. 2009

Figura 2. Resultado positivo mediante inmunocromatografía (ICT) de infección por *P. ovale*, *P. vivax* o *P. malariae* (imagen propiedad de los autores)



Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de antígenos de <i>Plasmodium</i> spp.	PNT-PI-02	
		Edición N° 02	Página 5 de 7

- Aparecerá una banda en la banda control (C) que indica que la prueba ha funcionado adecuadamente. La ausencia de una línea visible en esta banda invalida el test.
- La aparición de cualquier línea de prueba, aunque sea muy leve, indica un resultado positivo.
- La ausencia de otras bandas (sólo la banda C) indica un resultado negativo.
- La presencia de una línea de color en la banda T1 es indicativa de la presencia de *P. falciparum* en la muestra (antígeno HRP-2). En este caso normalmente aparecerá también una línea en la banda T2 (aldolasa).
- La presencia de una línea de color sólo en la banda T2 es indicativa de la presencia de *Plasmodium* spp. NO *falciparum* (*P. vivax*, *P. ovale* o *P. malariae*).
- Todos los resultados positivos se informarán inmediatamente al responsable de área así como al clínico responsable del paciente.

Banda visible	Interpretación
Control + T1 (HRP-2)	Infección por <i>P. falciparum</i>
Control + T1 (HRP-2) + T2 (aldolasa)	Infección por <i>P. falciparum</i> +/- infección mixta con otras especies
Control + T2 (aldolasa)	Infección por <i>Plasmodium</i> NO <i>falciparum</i> (<i>P. vivax</i> , <i>P. ovale</i> o <i>P. malariae</i>).
Sólo control +	Negativo
Ausencia de control, sólo T1, sólo T2 o T1 y T2.	Error de ejecución o reactivo defectuoso. Resultado inválido. Repetir

9. RESPONSABILIDADES

- Es responsabilidad del equipo de atención al paciente la sospecha de la infección o la realización de los protocolos de screening de la infección si corresponde, así como la correcta realización de la petición de la prueba, y la recogida, identificación y envío de la muestra.
- Es responsabilidad del área de recepción de muestras:
 Informar sobre cómo deben de recogerse y enviarse las muestras al servicio de microbiología.
 El rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas y la adopción de las correspondientes medidas correctoras.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de antígenos de <i>Plasmodium</i> spp.	PNT-PI-02	
		Edición N°2	Página 6 de 7

La recepción de la muestra correctamente identificada.

Avisar inmediatamente al área de parasitología cuando se reciba la muestra para su procesamiento inmediato

- Es responsabilidad del personal de secretaría la correcta transcripción de la información que manejen y de mantener su confidencialidad.
- Es responsabilidad del área de gestión de calidad la recepción y distribución de los controles de calidad externos.
- Es responsabilidad del técnico del área de parasitología:
 - El procesamiento de la muestra y la realización del test inmunocromatográfico.
 - El control de los productos almacenados y la solicitud de material fungible con la antelación adecuada.
- Es responsabilidad del responsable del área de parasitología:
 - La visualización e interpretación del resultado.
 - La emisión y validación de los resultados.
 - La investigación de las causas de error y la adopción de medidas correctoras.
- Las solicitudes urgentes durante las guardias se atenderán siguiendo los procedimientos previstos para estas situaciones. El responsable del área de parasitología revisará los resultados emitidos durante la guardia.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

- Los resultados tanto positivos como negativos deben de confirmarse con la visualización de una gota gruesa/extensión fina al microscopio.
- La sensibilidad del test no ha sido determinada adecuadamente con las especies de *P. ovale* y *P. malariae*, pudiéndose obtener resultados falsos negativos.
- La sensibilidad del test no ha sido determinada para *P. knowlesi*.
- Parasitemias bajas de *P. vivax* pueden dar resultados falsos negativos.
- No es posible distinguir una infección por una sola especie de una infección por especies mixtas con esta prueba.
- Esta prueba detecta antígenos de todos los estadios de *Plasmodium*, incluyendo gametocitos.
- Las muestras con factor reumatoide podrían dar resultados falsos positivos (especialmente con la proteína HRP-2).
- Es necesario realizar la técnica exactamente como se indica en este procedimiento.
- El reactivo A contiene azida sódica como conservante que es tóxica y produce compuestos explosivos al reaccionar con los metales, por ello hay que manipularla con precaución evitando su contacto con la piel y su ingestión. Si se desecha por el fregadero, dejar correr el agua unos minutos.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Se recomienda usar este test sólo en el diagnóstico de pacientes sintomáticos.
 - No debe de usarse en el screening en donantes de sangre ni en pacientes asintomáticos.
 - No debe usarse como seguimiento postratamiento ya que pueden detectarse antígenos residuales semanas después de un correcto tratamiento (especialmente en la proteína HRP-2).
 - En general, si se detecta antígeno de *Plasmodium* después de dos meses de finalizar el último tratamiento antimalárico, es muy probable que el paciente esté infectado.
- estos patógenos se detectan únicamente en la orina post-masaje; sin embargo, cuando se detectan en la

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de antígenos de <i>Plasmodium</i> spp.	PNT-PI-02	
		Edición N° 02	Página 7 de 7

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Luchavez J, Baker J, Alcantara S, et al. Laboratory demonstration of a prozone-like effect in HRP2-detecting malaria rapid diagnostic tests: implications for clinical management. *Malaria Journal* 2011; 10:286
2. Mukkala AN, Kwan J, Lau R, Harris D, Kain D, Boggild AK. An update on malaria rapid diagnostic tests. *Curr Infect Dis Rep.* 2018; 20(12):49.
3. Ranadive N, Kunene S, Darteh S, et al. Limitations of rapid diagnostic testing in patients with suspected malaria: a diagnostic accuracy evaluation from Swaziland, a low-endemicity country aiming for malaria elimination. *Clin Infect Dis.* 2017; 64:1221-7.
4. Thomson R, Beshir KB, Cunningham J, et al. pfhrp2 and pfhrp3 gene deletions that affect malaria rapid diagnostic tests for *Plasmodium falciparum*: analysis of archived blood samples from 3 African countries. *J Infect Dis.* 2019; 220:1444-52.
5. WHO. Malaria rapid diagnostic test performance results of WHO product testing of malaria RDTs: round 8 (2016–2018).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Trypanosoma spp.</i> en sangre	PNT-PI-03	
		Edición N° 2	Página 1 de 9

PNT-PI-03

Detección de *Trypanosoma spp.* en sangre

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2009	Edición inicial
02	2020	Segunda edición (actualización del PNT-PI-02 del Procedimiento SEIMC n° 35, publicado en 2009)

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Trypanosoma spp.</i> en sangre	PNT-PI-03	
		Edición N° 02	Página 2 de 9

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir el método de concentración y examen microscópico de tripanosomas en muestras de sangre y LCR.

Es un documento de consulta para el personal del laboratorio encargado de su realización e interpretación.

2. FUNDAMENTO

Trypanosoma spp. es un género de protozoos hemáticos y tisulares. Las especies principales patógenas para el hombre son: *T. cruzi*, que causa la enfermedad de Chagas y es endémico del continente americano y *T. brucei gambiense* y *T. brucei rhodesiense* (el *T. brucei brucei* sólo afecta a animales) que causan la enfermedad del sueño y son endémicos de África. *Trypanosoma rangeli* es endémico en América, parasita humanos, pero no se considera patógeno. Excepcionalmente se han descrito parasitaciones de humanos por otras especies diferentes a las nombradas.

La infección la transmite un artrópodo vector y también se puede adquirir por accidente de laboratorio o de persona a persona mediante transfusión, trasplante o por vía materno-fetal.

Los métodos diagnósticos (algunos sólo disponibles en centros de referencia) son serología, detección de ADN, cultivo, xenodiagnóstico y visualización del parásito en sangre periférica, LCR (en el caso de tripanosomiasis africana o meningoencefalitis chagásica) o biopsias de tejido.

En la enfermedad de Chagas la parasitemia sólo es detectable en la fase aguda o en fases tempranas, pudiendo reaparecer en periodos de inmunodepresión. En la tripanosomiasis africana la parasitemia aparece en la etapa hemolinfática y se hace intermitente en la fase neurológica.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Alados Arboledas JC, Gómez García de la Pedrosa E, Leiva León J, Pérez Sáenz JL, Rojo Molinero E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. 10a. Pérez Sáenz JL (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2014.

Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia10a.pdf>

- García-Lechuz Moya JM, González López JJ, Orta Mira N, Sánchez Romero MI. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero MI (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017.

Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1b.pdf>

- Organización Mundial de la Salud. Métodos Básicos de Laboratorio en Parasitología Médica. 1992.

Disponible en: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/38858/9243544101_\(part1\).pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/38858/9243544101_(part1).pdf?sequence=1)

- DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. CDC. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dpdx/reference.html>

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Trypanosoma spp.</i> en sangre	PNT-PI-03	
		Edición N° 02	Página 3 de 9

4. MUESTRAS

Son muestras aceptables:

- Para un examen directo: sangre de cordón umbilical o sangre periférica anticoagulada con EDTA o cualquier otro similar.
- Para microhematocrito: sangre de cordón umbilical o sangre periférica anticoagulada con EDTA o cualquier otro similar.
- Para la técnica de Strout: sangre extraída en tubo sin anticoagulante.

La visualización es más sensible cuanto antes se realice la técnica (preferiblemente en las 8 primeras horas tras la extracción de la sangre), ya que los parásitos van perdiendo movilidad con el paso del tiempo.

En ocasiones se pueden visualizar tripanosomas en LCR y en aspirados de chagomas, chancros de inoculación o ganglios linfáticos. En estos casos conviene contactar con el responsable de parasitología. Los tejidos también se deben examinar histológicamente en anatomía patológica.

La muestra se recepcionará en el área del laboratorio destinada a este fin acompañada de la copia del volante de petición (o registro informático) donde se comprobará qué entidad nosológica sospechada ha originado la petición y otros posibles datos clínicos y epidemiológicos de interés diagnóstico.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Plastilina común de uso escolar
- Metanol grado técnico
- Reactivo de Giemsa con tampón fosfato pH= 7,2
- Aceite de inmersión

Conservación y fechas de caducidad:

Las fechas de caducidad no son importantes para los reactivos utilizados en este procedimiento que se deben conservar a temperatura ambiente. Por tanto, podrán utilizarse independientemente de su fecha de caducidad nominal, a menos que haya algún signo de deterioro o contaminación del material o del reactivo. Los materiales empleados para las tinciones deberán estar limpios, pero no necesariamente estériles.

6. APARATOS Y MATERIAL

Material fungible:

- Guantes de látex
- Tubos capilares de microhematocrito. Son preferibles los de 1,6 mm de diámetro (cargan hasta 80 µl de muestra). También se pueden usar los de 1,1 mm de diámetro (sólo cargan hasta 20 µl de muestra) y vienen incluidos en algunas cajas de reactivos de detección de antígeno de malaria. En este último caso habría que preparar mayor número de tubos capilares.
- Tubos de centrifuga de polietileno.
- Rotulador permanente
- Pipetas Pasteur (estériles)
- Portaobjetos
- Cubreobjetos de 24x24 mm
- Cuaderno y lápiz para el registro
- Tubo de plástico transparente y flexible (tipo sistema de infusión intravenosa) cortado a 4 - 8 cm de largo.
- Gafas de protección ocular

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Trypanosoma spp.</i> en sangre	PNT-PI-03	
		Edición N° 02	Página 4 de 9

- Gafas de protección ocular
- Mascarilla
- Marcador de punta de diamante

Aparatos:

- Microscopio con objetivos de 10x, 40x y 100x
- Incubadora de 37°C
- Microcentrífuga de hematocrito o centrífuga convencional de tubos
- Cabina de flujo laminar

7. PROCEDIMIENTO

El método del microhematocrito para detección de *Trypanosoma spp.* data de los años 70. Actualmente las centrífugas de microhematocrito han caído en desuso. El procedimiento que se describe a continuación es una adaptación de la técnica del microhematocrito para poder realizarla con las centrífugas de uso habitual en los laboratorios de parasitología.

Procesamiento de sangre periférica:

El método a emplear dependerá del volumen de sangre disponible. Habitualmente se empleará el microhematocrito de sangre anticoagulada en neonatos (ver método 7.1) y el método de Strout con sangre sin anticoagulante en adultos (ver método 7.2).

7.1. PROCEDIMIENTO PARA EL EXAMEN DIRECTO Y DEL MICROHEMATOCRITO (ver esquema en el anexo I)

1. Maneje la muestra con extrema precaución: póngase guantes de látex y protector facial o gafas protectoras y mascarilla. Es aconsejable manipular las muestras en cabina de flujo laminar.
2. Prepare el material necesario. Si no trabaja en cabina de flujo laminar, coloque varias capas de papel de filtro en la zona de trabajo.
3. Antes de realizar la técnica del microhematocrito, es conveniente observar una gota de sangre en fresco, que puede ser suficiente para hacer un diagnóstico si la parasitemia es alta. Si los hematíes se han sedimentado algo, la muestra debe tomarse de la parte inferior del plasma sobrenadante.
4. Tras depositarla en un portaobjetos, cubrirla con un cubreobjetos y examinarla con el objetivo 10x. Sólo si no se observarán los tripomastigotes móviles, proseguir con la realización del microhematocrito.
5. Ponga una bola de plastilina de unos 5 mm de diámetro en el fondo del tubo de centrífuga y aplástelo con un lápiz de tal manera que ocupe todo el fondo del cono interior. Prepare así dos tubos para que hagan de contrapeso. Se puede utilizar también algodón como base en los tubos.
6. Cargue de sangre los 6 capilares de microhematocrito. Cierre un extremo de cada tubo clavándolos en plastilina. Si dispone de una centrífuga de microtubos procéselos a 3000xg durante 5 minutos y continúe en el punto número 8.
7. Ponga dos capilares en cada tubo de centrífuga con el polo tapado con plastilina hacia la parte inferior del tubo. Tape los tubos.
8. Centrifugue 10 minutos a 900xg.
9. Debido a la fuerza centrífuga en ocasiones se puede extravasar sangre o romperse el tubo. Si se ha salido sangre de alguno de los capilares, deseche el tubo de centrífuga que lo contiene.
10. Grabe una línea con el diamante alrededor del tubo capilar en el límite entre los hematíes y el sedimento de leucocitos. Conviene practicarlo antes con algún capilar vacío.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Trypanosoma spp.</i> en sangre	PNT-PI-03	
		Edición N° 02	Página 5 de 9

11. Proteja el capilar con el tubo de plástico flexible y pártalo en dos cuidadosamente, manteniendo el capilar en posición horizontal.
12. Descargue el grumo de leucocitos y plaquetas (que debería haber quedado en el extremo donde está el plasma) en un portaobjetos, ponga un cubreobjetos y examine toda la muestra inmediatamente con el objetivo de 10x en busca de organismos móviles.
13. Repita los puntos 10 al 12 con el resto de los capilares. Es aconsejable que el material obtenido de al menos uno de los capilares se extienda en un portaobjetos y se deje secar para realizar una tinción de Giemsa. Si la muestra tiene muchos hematíes es mejor hacerlo sin fijarla con metanol (como una gota gruesa, ver PNT-PI-01 de este procedimiento). Esta tinción permanente servirá para confirmar los resultados del examen en fresco y para tratar de detectar los casos en los que el parásito hubiese perdido movilidad y por ello no se hubiera visto en el examen en fresco.
14. Anote los resultados en la hoja de trabajo y en el sistema informático. Las tinciones permanentes se conservarán al menos hasta disponer de las otras pruebas diagnósticas solicitadas (serología y PCR).
15. Recoja el material, tire los capilares de forma segura. Deje en la nevera la sangre sobrante para realizar una PCR posteriormente.

7.2. PROCEDIMIENTO DE CONCENTRACIÓN DE STROUT

1. Maneje la muestra con extrema precaución: póngase guantes de látex y protector facial o gafas protectoras y mascarilla. Es aconsejable manipular las muestras en cabina de flujo laminar.
2. Prepare el material necesario. Si no trabaja en campana de flujo laminar, coloque papel de filtro en la zona de trabajo.
3. Tras la extracción de al menos 3 ml de sangre permita que se coagule y que se retraiga el coágulo (aproximadamente 2 horas a 37°C).
4. Extraiga el suero y centrifúguelo a 50 xg durante 5 minutos.
5. Transvase el sobrenadante a otro tubo y centrifúguelo a 400 xg durante 10 minutos.
6. Decante el sobrenadante y con el sedimento prepare dos extensiones finas para tinción de Giemsa y en otro portaobjetos realice el examen en fresco.
7. Ponga un cubreobjetos sobre el concentrado y examínelo inmediatamente con el objetivo de 10x en busca de organismos móviles. Puede usar el objetivo de 40x para confirmar su morfología.
8. Realice una tinción de Giemsa de las otras dos extensiones. Si la muestra ha sido correctamente preparada se observarán plaquetas casi con exclusividad.
9. Anote los resultados en la hoja de trabajo y en el sistema informático. Las tinciones permanentes se conservarán al menos hasta disponer de las otras pruebas diagnósticas solicitadas (serología, PCR, etc.).
10. Recoja el material, tire el material fungible de forma segura. Si procede, deje en la nevera la sangre sobrante para realizar la PCR, posteriormente.

Controles:

Controles externos: pueden ser suministrados por cualquier programa de control de calidad de diferentes organismos nacionales o internacionales de control de calidad.

Controles internos: pueden prepararse en el laboratorio si se dispone de una cepa de *Trypanosoma spp.* cultivada *in vitro* o de animales de experimentación infectados.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Los parásitos se identificarán visualmente (tanto en las extensiones teñidas de la muestra original como en los exámenes en fresco) sobre la base de su tamaño, características tintoriales y morfología. La PCR

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Trypanosoma spp.</i> en sangre	PNT-PI-03	
		Edición N°2	Página 6 de 9

deberá confirmar los resultados positivos.

Todos los resultados positivos se comentarán de inmediato al responsable del área para su confirmación. Se informarán telefónicamente al médico responsable del paciente los resultados con hallazgos significativos, previa consulta al responsable del área.

Todos los resultados obtenidos se emitirán por el sistema habitual lo antes posible tras ser validados por el responsable del área.

En las muestras rechazadas se indicará la causa del rechazo: muestra no adecuada para el examen solicitado, sangre coagulada, muestra derramada, etc.

9. RESPONSABILIDADES

Es responsabilidad del equipo de atención al paciente:

1. La sospecha de infección o en su caso la cumplimentación de los protocolos de despistaje de infección en las situaciones en las que proceda.
2. La adecuada tramitación de la solicitud, y la correcta recogida identificación y envío de la muestra.

Es responsabilidad del equipo del área de recepción de muestras:

1. Informar sobre cómo deben recogerse y enviarse las muestras al laboratorio.
2. El rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas y la adopción de las correspondientes medidas correctoras.
3. La recepción de la muestra con su volante correspondiente y su identificación.
4. Avisar de forma inmediata al área de parasitología cuando se reciba la muestra para su inmediato procesamiento.

Es responsabilidad del personal de secretaría la correcta transcripción de la información que manejen y de mantener la confidencialidad de esta.

Es responsabilidad del equipo del área gestión de calidad la recepción e introducción de los controles de calidad externos.

Es responsabilidad del técnico encargado del procesamiento de muestras para parásitos:

1. El procesamiento y el examen de las extensiones.
2. El registro y la emisión de resultados.
3. La preparación de los reactivos, la rotación de los productos almacenados y la solicitud del material fungible con la antelación adecuada.

Es responsabilidad del responsable del área, la supervisión de los resultados negativos, positivos o dudosos, la validación y firma de los informes de resultados, la investigación de las causas de error y la adopción de medidas correctoras. También debe encargarse de que los resultados positivos sean conocidos de forma fehaciente por el médico responsable del paciente. El responsable podrá reasignar temporalmente alguna de estas funciones a otro personal con cualificación suficiente.

Las solicitudes urgentes durante las guardias se atenderán siguiendo los procedimientos previstos para estas situaciones.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

La fuerza centrífuga (g) aplicada a la muestra depende del radio de giro y del número de revoluciones por unidad de tiempo. Si la centrífuga utilizada no se programa por número de g sino por r.p.m. se debe crear una tabla con las equivalencias entre ambas magnitudes.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Trypanosoma spp.</i> en sangre	PNT-PI-03	
		Edición N° 02	Página 7 de 9

Los tripanosomas son los únicos protozoos hemáticos extracelulares en humanos. En ocasiones se pueden observar *Babesia spp.* o *Leishmania spp.* procedentes de células hemáticas rotas. En ocasiones puede inducir a error la presencia, en muestras de sangre de pacientes con malaria, los gametocitos exflagelados.

En muestras de recién nacidos, algunas veces las plaquetas pueden llevar a confusión.

Trypanosoma rangeli es morfológicamente similar al *T. brucei*, pero es endémico de zonas de Iberoamérica y en algunas zonas de Centroamérica es más frecuente que *T. cruzi*.

El medio de NNN utilizado para *Leishmania spp.* también permite el crecimiento de *Trypanosoma spp.*, pero es lento y laborioso y ha sido desplazado por técnicas de PCR.

El xenodiagnóstico con triatominos es muy sensible pero sus resultados se demoran también varias semanas y exigiría la presencia de vinchucas vivas y ESTA CONTRAINDICADO por el riesgo de introducción de vectores en nuevas áreas geográficas, salvo en centros de referencia. Por su bajo coste y alta sensibilidad se podría realizar en zonas endémicas empleando vectores locales no infectados.

El reconocimiento de la presencia de *Trypanosoma spp.* requiere de cierta experiencia. Para la identificación a nivel de especie se deben considerar los antecedentes epidemiológicos.

Como norma general se recomienda el empleo de técnicas de PCR para confirmar sospechas de infección no demostradas microscópicamente o de interés epidemiológico.

Si la sospecha es una infección por *T. cruzi*, también es conveniente analizar la muestra mediante pruebas serológicas.

Procedimientos alternativos aceptables:

Examen en fresco inmediato de aspirados de ganglios o chancros de inoculación en tripanosomiasis africana. El líquido cefalorraquídeo se debe centrifugar 10 min a 900 xg y examinar de inmediato el sedimento. En lugar de extraer el contenido de los tubos partiéndolos, algunos microscopistas avezados prefieren fijar los tubos ya centrifugados a un portaobjetos con plastilina, líquido de montaje o laca de uñas, y examinarlos directamente al microscopio buscando organismos extracelulares moviéndose en el límite entre suero y hematíes. También se puede adherir el capilar con la ayuda de una cinta adhesiva en la parte lateral de un portaobjetos, y examinar la interfase con el objetivo de 10x en busca de parásitos móviles.

La visualización también puede hacerse centrifugando la muestra de sangre y recogiendo, para examen en fresco y tinción, la capa de plaquetas y leucocitos que queda sobre la capa de hematíes (*buffy coat*).

Existe un procedimiento de concentración muy sensible que requiere el empleo de una columna de intercambio aniónico.

Como alternativa a la técnica de Strout existe un método de concentración por triple centrifugación aplicable a muestras de sangre con anticoagulante (centrifugar sangre a 300 xg 10 min, tomar el sobrenadante y centrifugarlo a 500 xg 10 min, tomar el sobrenadante y centrifugarlo a 900 xg 10 min y observar el sedimento de este tercer tubo).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Trypanosoma spp.</i> en sangre	PNT-PI-03	
		Edición N° 02	Página 8 de 9

Tiempo de entrega de resultados de muestras urgentes:

Todo el proceso puede llegar a realizarse en menos de 3 horas. Es conveniente tomar fotografías o grabar un video para la confirmación del resultado por parte de un especialista.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La negatividad del examen no excluye la parasitación, es conveniente complementar el estudio mediante PCR.

En la enfermedad de Chagas durante la fase indeterminada y en la infección crónica el examen microscópico de sangre generalme

En la tripanosomiasis africana estas fluctuaciones son características de los cambios antigénicos del parásito.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Freilij H, Muller L, González Cappa SM. Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas disease. J Clin Microbiol. 1983;18:327-330.
2. Garcia LS. Diagnostic Medical Parasitology. 5ª Edición, ASM Press Washington, D.C. 2007.
3. Strout, RG. A method for concentrating hemoflagellates. J Parasitol. 1962; 48:100-102.
4. Vera-Ku M, Meza-González G, Carlier Y, Truyens C, Gamboa-León R. Comparison of methodologies for detecting *Trypanosoma cruzi* parasites by microscopic observation of microhematocrit capillary tubes. Rev Soc Bras Med Trop. 2019; 52:e20180505.

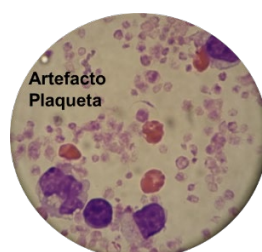
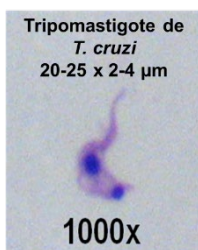
Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Trypanosoma spp.</i> en sangre	PNT-PI-03	
		Edición N° 02	Página 9 de 9

Anexo I

Procedimiento del microhematocrito para detección de *Trypanosoma spp.* en sangre TRIPANOSOMAS EN SANGRE: CONCENTRACIÓN POR MICROHEMATOCRITO

LA MUESTRA DEBE PROCESARSE DE INMEDIATO

- 1.- Maneje la muestra como potencialmente infectante: póngase guantes de látex, gafas protectoras y mascarilla. Prepare el material necesario.
- 2.- Ponga una bola de plastilina en el fondo del tubo de centrifuga y aplástelo con un lápiz. Prepare así dos tubos.
- 3.- Cargue de sangre 6 capilares de microhematocrito. Cierre un extremo de cada tubo clavándolos en plastilina.
- 4.- Ponga dos capilares en cada tubo de centrifuga con el polo tapado hacia la parte inferior del tubo y ciérrelos enroscando su tapón.
- 5.- Centrifugue 10 minutos a 900 xg (o "XX" rpm en la centrifuga correspondiente).
- 6.- Protéjase los ojos con las gafas y grabe una línea con el diamante alrededor del tubo capilar en el límite entre los hematíes y el sedimento de leucocitos.
- 7.- Proteja el capilar con el tubo de plástico flexible y pártalo en dos mitades cuidadosamente, manteniendo el capilar en posición horizontal.
- 8.- Descargue el grumo de leucocitos y plaquetas en un portaobjetos, ponga un cubreobjetos y examine con el objetivo de 10x en busca de organismos móviles.
- 9.- Repita los puntos 6 al 8 con el resto de los capilares.
- 10.- Extienda en un portaobjetos el material obtenido de uno de los capilares y déjelo secar para realizar una tinción de Giemsa. Si la muestra tiene muchos hematíes es mejor hacerlo sin fijar con metanol (como una gota gruesa).
- 11.- Esta tinción permanente servirá para confirmar los resultados del examen en fresco y para tratar de detectar los casos en los que el parásito hubiese perdido movilidad y por ello no se hubiera detectado en el examen en fresco.
- 12.- Registre los resultados del examen directo y emita un informe.
- 13.- Recoja el material, tire los capilares de forma segura.
- 14.- Conservar la sangre sobrante para realizar la detección molecular de *T. cruzi* o *T.b gambiense/T.b. rhodesiense* mediante PCR.



Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Leishmania</i> spp. en muestras clínicas	PNT-PI-04	
		Edición N° 2	Página 1 de 8

PNT-PI-04

Detección de *Leishmania* spp. en muestras clínicas

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2009	Edición inicial
02	2020	Segunda edición (actualización del PNT-PI-04 del Procedimiento SEIMC n° 35, publicado en 2009)

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Leishmania</i> spp. en muestras clínicas	PNT-PI-04	
		Edición Nº 02	Página 2 de 8

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del este documento es describir el procedimiento de detección de *Leishmania* spp. en muestras clínicas mediante tinción y cultivo.

Es un documento de consulta para el personal del laboratorio encargado de su realización e interpretación.

2. FUNDAMENTO

Leishmania spp. es un género constituido por protozoos hemáticos y tisulares ampliamente distribuidos por el mundo. *Leishmania infantum* es la única especie endémica en España. Las formas cutáneas se observan a cualquier edad, mientras que las formas viscerales se producen fundamentalmente en niños pequeños y en adultos inmunodeprimidos o malnutridos.

Las leishmaniasis causadas por otras especies se detectan en viajeros, turistas e inmigrantes que hayan estado en zonas endémicas. La forma clínica más frecuente suele ser la cutánea y con menor frecuencia la mucocutánea.

La infección por este protozoo se diagnostica mediante el examen de extensiones teñidas de médula ósea, tejido cutáneo, de la capa leucocitaria de sangre periférica y excepcionalmente en otras muestras. El cultivo de estas muestras aumenta la sensibilidad respecto al examen directo y se realiza rutinariamente cuando se remite una muestra al laboratorio para descartar leishmaniasis. Actualmente, la PCR es la técnica de mayor sensibilidad. La serología es útil en pacientes con afectación visceral o mucocutánea y que no estén inmunosuprimidos.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Alados Arboledas JC, Gómez García de la Pedrosa E, Leiva León J, Pérez Sáenz JL, Rojo Molinero E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. 10a. Pérez Sáenz JL (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2014.

Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia10a.pdf>

- García-Lechuz Moya JM, González López JJ, Orta Mira N, Sánchez Romero MI. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero MI (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017.

Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1b.pdf>

DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. CDC. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dpdx/reference.html>

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Leishmania</i> spp. en muestras clínicas	PNT-PI-04	
		Edición N° 02	Página 3 de 8

4. MUESTRAS

- 1.- Sangre anticoagulada con heparina (tapón verde). La sangre anticoagulada con EDTA (tubo tapón morado).
- 2.- Médula ósea recogida en tubo con anticoagulante EDTA (tubo tapón morado).
- 3.- Biopsias recientes o parafinadas, punción aspiración e improntas de cualquier tejido sospechoso de afectación por *Leishmania* spp. Ocasionalmente secreciones respiratorias u otras muestras.
- 4.- La muestra se recepcionará en el área del laboratorio destinada a este fin, acompañada de la copia del volante de petición donde se comprobará qué entidad nosológica sospechada ha originado la petición, así como otros posibles datos epidemiológicos de interés diagnóstico.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

Reactivos y productos:

- Metanol grado técnico.
- Medio de cultivo RPMI 1640 completo (RPMI 1640 + suero fetal bovino 10% + antibióticos)
- Reactivo de Giemsa
- Suero fisiológico
- Agua destilada
- Aceite de inmersión
- Buffer de lisis estéril (NET 10: NaCl 0,1 M; EDTA 10 mM, Tris 10 mM, pH 8)
- Medio de Novy, Nicolle y McNeal (NNN) con antibióticos (estéril)

Conservación y fechas de caducidad:

Las fechas de caducidad son importantes para los medios de cultivo. No lo son, en cambio para el resto de los materiales utilizados en este procedimiento. Por tanto, podrán utilizarse independientemente de su fecha de caducidad nominal, a menos que haya algún signo de deterioro o contaminación del material o del reactivo. Todos los materiales que entren en contacto con la muestra original o con los medios de cultivo deberán ser estériles. Los materiales empleados para las tinciones deberán estar limpios, pero no necesariamente estériles. El medio NNN, el buffer de lisis y el RPMI 1640 completo se conservarán en nevera. El resto se conserva a temperatura ambiente.

6. APARATOS Y MATERIAL

Material fungible:

- Guantes de látex
- Tubos estériles
- Rotulador permanente
- Pipetas Pasteur (estériles)
- Portaobjetos
- Cubreobjetos de 24x24 mm
- Cuaderno y lápiz para el registro

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Leishmania</i> spp. en muestras clínicas	PNT-PI-04	
		Edición N° 02	Página 4 de 8

Aparatos:

- Microscopio
- Incubadora de 27°C

7. PROCEDIMIENTO**Sangre periférica médula ósea, otros fluidos y biopsias de tejido (ver esquema Anexo I).**

- 1.- Póngase guantes de látex. Considere la muestra como potencialmente infectante.
- 2.- Prepare el material necesario. Utilice técnica estéril.
- 3.- Atemperar los medios de cultivo.
- 4.- Añadir 100 µL de medio RPMI 1640 completo.
- 5.- Añadir 100 µL de la muestra en un tubo de NNN y déjelo en incubación a temperatura ambiente o en estufa a 27°C (si la muestra es una biopsia de tejido, triturarla previamente en solución salina o buffer de lisis; 50 µL del lisado y que contenga la mayor parte de los trocitos de tejido, se depositan en el tubo de NNN, el material restante se analiza mediante PCR).
- 6.- Con otra parte de la muestra realizar una extensión fina o gruesa (según el tipo de muestra).
- 7.- Deje secar completamente la extensión del portaobjetos.
- 8.- Fíjela con metanol al 100% durante 5 minutos.
- 9.- Deje secar el metanol.
- 10.- Tiña con colorante Giemsa diluido 1/10 en buffer durante 30 minutos.
- 11.- Examine la extensión con los objetivos de 40x y 100x.
- 12.- Anote los resultados del examen directo en el cuaderno de trabajo y posteriormente en la hoja del libro de registro.
- 13.- Los cultivos se examinarán una vez por semana durante al menos un mes. A la vez, cada semana se debe realizar un pase de toda la muestra a un nuevo tubo de NNN. Si se notase pérdida de volumen de muestra, se debe añadir 100 µL de medio RPMI 1640 completo.
- 14.- Se debe llevar un registro de cuándo se examinan las muestras, rellenando una hoja de control de cultivos de *Leishmania* spp.
- 15.- Para detectar el crecimiento en los cultivos examine en fresco una pequeña cantidad de líquido entre portaobjetos y cubreobjetos con el objetivo de 20x ó 40x. Evite la formación de aerosoles y utilice una cabina de flujo laminar que proteja de contaminaciones a la muestra y al usuario.

Controles:

Controles externos: serán proporcionados por diferentes organismos de control de calidad a los que esté adscrito el laboratorio y se realizarán según las instrucciones de los mismos. Los resultados (positivos o negativos) deberán ser supervisados por el responsable del área antes de que se emitan.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Los parásitos se identificarán visualmente (tanto en las extensiones teñidas de la muestra original como en los exámenes en fresco de los cultivos) sobre la base de su tamaño, características tintoriales y morfología.

Todos los resultados positivos se comentarán de inmediato al responsable del área. Se informarán telefónicamente los resultados con hallazgos significativos y se introducirán en el ordenador para emitir los resultados definitivos al clínico solicitante.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Leishmania</i> spp. en muestras clínicas	PNT-PI-04	
		Edición N° 02	Página 5 de 8

Los resultados negativos de la tinción se considerarán preliminares hasta que finalice la incubación de los cultivos.

Si el resultado es positivo en las extensiones teñidas, se informará como: “Se observan parásitos: amastigotes de *Leishmania* spp.”

Cuando el responsable del área lo considere necesario se podrá incluir un comentario aclaratorio en el aislado correspondiente.

Si el resultado es negativo se informará como: “No se observan parásitos. No se observan amastigotes de *Leishmania* spp. Pendiente del cultivo de *Leishmania* spp.”

Todos los resultados obtenidos a lo largo del día se emitirán en el día. Todos los volantes de salida deberán ser revisados por el adjunto responsable del área.

En las muestras rechazadas se indicará la causa del rechazo: muestra no adecuada para el examen solicitado, sangre coagulada, muestra derramada, etc.

9. RESPONSABILIDADES

Es responsabilidad del equipo de atención al paciente:

1. La sospecha de infección o en su caso la cumplimentación de los protocolos de despistaje de infección en las situaciones en las que proceda.
2. La adecuada tramitación de la solicitud, y la correcta recogida identificación y envío de la muestra.

Es responsabilidad del equipo del área de recepción de muestras:

1. Informar sobre cómo deben recogerse y enviarse las muestras al laboratorio.
2. El rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas y la adopción de las correspondientes medidas correctoras.
3. La recepción de la muestra con su volante correspondiente y su identificación.
4. Avisar de forma inmediata al área de parasitología cuando se reciba la muestra para su inmediato procesamiento.

Es responsabilidad del personal de secretaría la correcta transcripción de la información que manejen y de mantener la confidencialidad de esta.

Es responsabilidad del equipo del área gestión de calidad la recepción e introducción de los controles de calidad externos.

Es responsabilidad del técnico encargado del procesamiento de muestras para parásitos:

1. El procesamiento y el examen de las extensiones.
2. El registro y la emisión de resultados.
3. La preparación de los reactivos, la rotación de los productos almacenados y la solicitud del material fungible con la antelación adecuada.

Es responsabilidad del responsable del área la supervisión de los resultados negativos, positivos o dudosos, la validación y firma de los informes de resultados, la investigación de las causas de error y la

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Leishmania</i> spp. en muestras clínicas	PNT-PI-04	
		Edición N°2	Página 6 de 8

adopción de medidas correctoras. También debe encargarse de que los resultados positivos sean conocidos de forma fehaciente por el médico responsable del paciente y de que el caso se declare al registro epidemiológico por la vía que corresponda. El responsable podrá reasignar temporalmente alguna de estas funciones a otro personal con cualificación suficiente.

Las solicitudes urgentes durante las guardias se atenderán siguiendo los procedimientos previstos para esas situaciones.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

El medio de NNN también permite el crecimiento de *Trypanosoma* spp.

Las muestras clínicas procesadas podrían contener hongos regionales dimórficos patógenos (*Histoplasma* spp., *Coccidioides* spp., *Paracoccidioides* spp., *Sporothrix* spp., etc.) que pueden producir cuadros clínicos muy similares. Los cultivos al incubarse a temperatura ambiente podrían contener la forma filamentosa (infectante) de estos, por lo que se deben manipular en cabina de seguridad. Por la misma razón, también debe identificarse cualquier hongo que crezca en medio NNN. Se deben extremar las precauciones para evitar que se contaminen los tubos de NNN, especialmente con hongos. No es aconsejable añadir antifúngicos a los medios de cultivo porque pueden interferir con el crecimiento de *Leishmania* spp.

No está establecido el plazo de caducidad del medio NNN. No se aconseja utilizar los medios que estén retraídos o parcialmente deshidratados.

Reconocimiento de *Leishmania* spp. y posibles causas de error:

El reconocimiento de la presencia *Leishmania* spp. requiere de cierta experiencia. La identificación a nivel de especie se puede suponer por los antecedentes epidemiológicos. Cuando se considere interesante para la identificación de especie, se deberá enviar un tubo de NNN o de un medio equivalente, con la cepa en cuestión al Centro Nacional de Referencia de Parasitología correspondiente.

En muestras teñidas suele ser mucho más fácil encontrar amastigotes extracelulares (procedentes de células rotas) que intraleucocitarios. La presencia de un organismo con un núcleo y un kinetoplasto es diagnóstica de leishmaniasis (o de tripanosomiasis).

Las granulaciones de las plaquetas pueden ser causa de error. La presencia de células intraleucocitarias similares carentes de kinetoplasto deben hacer sospechar de histoplasmosis.

Procedimientos alternativos aceptables:

El medio líquido de Schneider suplementado es una alternativa válida para el cultivo de *Leishmania* spp., su rentabilidad diagnóstica varía según la especie de *Leishmania* infectante.

La concentración también puede hacerse por métodos de centrifugación sedimentación: centrifugar el tubo de sangre anticoagulada a 100 xg durante 30 minutos y recoger para cultivo y tinción la capa leucocitaria que queda sobre la capa de hematíes (*buffy coat*).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Leishmania</i> spp. en muestras clínicas	PNT-PI-04	
		Edición N° 02	Página 7 de 8

Tiempo de entrega de muestras urgentes:

Todo el proceso de la tinción con Giemsa puede llegar a realizarse en menos de 3 horas. La confirmación (por parte del responsable del área) de un resultado puede demorarse un máximo de 16 horas. Es recomendable tomar fotografías. Los cultivos habitualmente son positivos entre los 7 y 15 días de incubación, pero pueden tardar hasta 4 semanas en positivizarse.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La prueba puede ser negativa lo que no excluye la parasitación ante una historia compatible, especialmente con las muestras de sangre periférica. La médula ósea y la punción esplénica tienen mucha mayor rentabilidad diagnóstica (cercana al 90%).

Algunas especies de *Leishmania* pueden no crecer en este medio de cultivo (cepas excepcionales en el área mediterránea).

12. BIBLIOGRAFÍA

1. García LS. Diagnostic Medical Parasitology. 5ª Edición, ASM Press Washington, D.C. 2007
2. Markell EK, Voge M, John DT. Medical Parasitology. 6ª Edición, WB Saunders Company, Philadelphia. USA. 1986.
3. Practical guide for specimen collection and reference diagnosis of leishmaniasis.
Disponible en:
https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/resources/pdf/cdc_diagnosis_guide_leishmaniasis_2016.pdf

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Leishmania</i> spp. en muestras clínicas	PNT-PI-04	
		Edición N° 02	Página 8 de 8

Anexo I Esquema del procesamiento para la detección de *Leishmania* spp.

Procedimiento:

- 1.- Póngase guantes de látex. Considere la muestra como si estuviera infectada por el VIH.
- 2.- Prepare el material necesario. Utilice técnica estéril.
- 3.- Atemperar los tubos.
- 4.- Añadir 100 µL de medio RPMI completo.
- 5.- Inocular 100 µL de muestra en un tubo de NNN y déjelo cerrado a temperatura ambiente o en estufa a 27°C (si la muestra es una biopsia, ésta se debe triturar).
- 6.- Con otra parte de la muestra realizar una extensión fina y otra gruesa (la muestra clínica residual debe analizarse mediante PCR).
- 7.- Deje secar completamente la extensión del portaobjetos.
- 8.- Fíjela con metanol al 100% durante unos cinco minutos.
- 9.- Deje secar el metanol.
- 10.- Tiña con colorante Giemsa diluido 1/10 en buffer durante 30 minutos.
- 11.- Examine la extensión con los objetivos de 40x y 100x.
- 12.- Registre los resultados.
- 13.- Los cultivos se examinarán una vez por semana durante al menos un mes. A la vez se realizará un pase de toda la muestra a un tubo nuevo de NNN.
- 14.- Para detectar crecimiento en los cultivos examine en fresco una pequeña cantidad de líquido entre portaobjetos y cubreobjetos con el objetivo de 20x o 40x.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Examen de filarias en sangre	PNT-PI-05	
		Edición N° 2	Página 1 de 6

PNT-PI-05 Examen de filarias en sangre

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2009	Edición inicial
02	2020	Segunda edición (actualización del PNT-PI-05 del Procedimiento SEIMC n° 35, publicado en 2009)

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Examen de filarias en sangre	PNT-PI-05	
		Edición N° 02	Página 2 de 6

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir el método de detección mediante concentración y tinción para la identificación de microfilarias en sangre periférica (técnica de concentración de Knott).

Es un documento de consulta para el personal del laboratorio encargado de su realización e interpretación.

2. FUNDAMENTO

Las filarias son un grupo de nematodos muy variado. Algunas de ellas liberan al torrente sanguíneo microfilarias (uno de sus estadios larvarios), que pueden ser detectados en sangre periférica para su diagnóstico.

Para el diagnóstico de filarias es importante conocer su ciclo vital y saber en qué periodos del día hay más microfilarias en sangre periférica:

- *Wuchereria bancrofti* y *Brugia malayi* se buscarán en sangre periférica extraída a medianoche (entre las 10 p.m. y las 2 a.m.).
- En *Loa loa* y *Mansonella perstans* tendrá que extraerse la sangre periférica a mediodía (entre las 10 a.m. y las 14 p.m.).

Aún así, el número de microfilarias suele ser bajo (menos de una por mililitro), por lo que es necesario realizar una concentración de la muestra para poder detectarlas. Hay diferentes métodos de filtración y concentración. En este documento se describe el método de concentración de Knott.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Alados Arboledas JC, Gómez García de la Pedrosa E, Leiva León J, Pérez Sáenz JL, Rojo Molinero E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. 10a. Pérez Sáenz JL (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2014.

Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia10a.pdf>

- García-Lechuz Moya JM, González López JJ, Orta Mira N, Sánchez Romero MI. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero MI (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017.

Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1b.pdf>

- Organización Mundial de la Salud. Métodos Básicos de Laboratorio en Parasitología Médica. 1992.

Disponible en: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/38858/9243544101_\(part1\).pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/38858/9243544101_(part1).pdf?sequence=1)

- DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. CDC. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dpdx/reference.html>

- Chiodini PL, Moody AH, Manser DW. Atlas of medical helminthology and protozoology. Fourth edition. 2001.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Examen de filarias en sangre	PNT-PI-05	
		Edición N° 02	Página 3 de 6

4. MUESTRAS

Muestra de sangre periférica extraída en tubo con EDTA o heparina.

También podría realizarse en sangre capilar mediante punción del pulpejo del dedo para examen de gota gruesa sin realizar concentración ni filtrado.

El procesamiento debe de realizarse lo antes posible, aunque son aceptables muestras conservadas en nevera por un periodo no superior a 48 horas.

La muestra se recepcionará en el área correspondiente donde se comprobará el cuadro clínico que ha originado la petición, así como los datos epidemiológicos de interés diagnóstico.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Metanol
- Colorante Giemsa
- Agua destilada
- Formaldehído
- Aceite de inmersión

6. APARATOS Y MATERIAL

Material fungible:

- Guantes
- Tubo de centrifuga
- Probeta de 100 ml
- Pipetas no estériles de 1 ml
- Portaobjetos
- Cubreobjetos

Aparatos:

- Microscopio
- Centrifuga

7. PROCEDIMIENTO

- Ponerse guantes de látex
- Preparar formalina al 2%: 49 ml de agua destilada + 1 ml de formaldehído.
- Colocar 1 ml de sangre con EDTA en un tubo de centrifuga y añadir 9 ml de formalina al 2%.
- Mezclar y esperar 30 minutos.
- Centrifugar a 2000 r.p.m. 10 minutos.
- Decantar el sobrenadante, observar todo el sedimento, depositando cantidades aproximadas a las de una gota gruesa en cada porta con un cubreobjetos.
- Observar al microscopio en fresco con aumento de 10x en busca de microfilarias.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Examen de filarias en sangre	PNT-PI-05	
		Edición N° 02	Página 4 de 6

- Si se observan microfilarias, teñir con colorante de Giemsa al 10% durante 10 minutos (como una gota gruesa).
- Observar con el objetivo de inmersión para ver las características diferenciales entre especies.
- Contar el número de microfilarias observadas en todo el sedimento y multiplicar por 100 para dar el número de microfilarias/mL o hacer una preparación de 5 microlitros, contar el número de microfilarias en toda la preparación y multiplicar por 200.

Controles externos: serán proporcionados por las entidades de control de calidad a las que esté adscrito el laboratorio, y se realizarán según las instrucciones de las mismas.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

El sedimento de la concentración será observado en fresco con aumento de 10x en busca de microfilarias. Si se ve una microfilaria se teñirán con Giemsa las extensiones y serán observados con el objetivo de inmersión por el responsable del área de parasitología para identificar la especie según las características de cada especie tal como se indica la **tabla 1**.

Tabla1. Características diferenciales de las filarias

Especie	<i>Loa loa</i>	<i>Onchocerca</i>	<i>Wuchereria bancrofti</i>	<i>Brugia malayi</i>	<i>Brugia timori</i>	<i>Mansonella perstans</i>	<i>Mansonella streptocerca</i>	<i>Mansonella ozzardi</i>
Distribución geográfica	África central y oeste	África y América	Casi todas las zonas tropicales y subtropicales	Asia, India, Indonesia, Malasia, Filipinas e islas del Pacífico	Islas Timor e Indonesia	África tropical. Casos esporádicos en América Central y Sur América	Zona central y oeste de África	América Central y Sur América
Vector	<i>Chrysops</i>	<i>Simulium</i>	<i>Culex</i> , <i>Anopheles</i> , <i>Aedes</i> y <i>Mansonia</i>	<i>Culex</i> , <i>Anopheles</i> , <i>Aedes</i> y <i>Mansonia</i>	<i>Culex</i> , <i>Anopheles</i> , <i>Aedes</i> y <i>Mansonia</i>	Mosquitos del género <i>Culicoides</i>	Mosquitos del género <i>Culicoides</i>	<i>Simulium</i> , Mosquitos del género <i>Culicoides</i> y no- <i>Culicoides</i>
Hábitat de forma adulta	Tejido subcutáneo, conjuntiva	Tejido subcutáneo profundo	Sistema linfático	Sistema linfático	Sistema linfático	Sangre	Dermis	Tejido subcutáneo
Hábitat de microfilaria	Sangre	Piel	Sangre	Sangre	Sangre	Sangre	Piel	Sangre*
Periodicidad	diurna	no	nocturna	nocturna	nocturna	no	no	no
Vaina	si	no	si	si	si	no	no	no
tamaño	Larga y ancha. 250-300x 8-10 µm	Larga y ancha. 240-360x 5-9 µm	Larga y ancha 275-300x 8-10 µm	Larga y ancha 200-275x 5-6 µm	Larga y ancha 290-325x 5-6 µm	Corta y fina. 190-240x4,5 µm	Corta y fina. 180-240x4,5 µm	Corta y fina. 150-200x4,5 µm
Cuerpo y cola	Numerosas curvas, núcleos densos hasta el final. Cola redondeada.	No núcleos al final de la cola, ésta es puntiaguda	Pocas curvas, menos núcleos, no llegan al final. Cola apuntada.	Dos núcleos al final de la cola claramente separados.	Dos núcleos al final de la cola claramente separados. Más larga que <i>B. malayi</i> , núcleos menos densos y mayor espacio en la cabeza	Núcleos hasta el final de la cola que es redonda	Núcleos hasta el final de la cola que es redonda y generalmente curvada	No núcleos en el final de la cola. La cola es puntiaguda

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Examen de filarias en sangre	PNT-PI-05	
		Edición N° 02	Página 5 de 6

9. RESPONSABILIDADES

Es responsabilidad del equipo de atención al paciente:

La sospecha de la infección o la cumplimentación de los protocolos de despistaje de infección cuando proceda.

La adecuada tramitación de la solicitud, y la correcta recogida, identificación y envío de la muestra.

Es responsabilidad del equipo del área de recepción de muestras:

Informar sobre cómo deben recogerse y enviarse las muestras al laboratorio.

Rechazar las muestras remitidas en condiciones defectuosas y la adopción de las correspondientes medidas correctoras.

La recepción de la muestra correctamente identificada

Avisar de forma inmediata al área de parasitología cuando se reciba la muestra para su procesamiento.

Es responsabilidad del personal de secretaría la correcta transcripción de la información que manejen y de mantener la confidencialidad de esta.

Es responsabilidad del equipo del área gestión de calidad la recepción e introducción de los controles de calidad externos.

Es responsabilidad del técnico encargado del procesamiento de muestras para parásitos:

El procesamiento de la técnica de concentración y de las extensiones.

El registro y la emisión de resultados.

La preparación de los reactivos, la rotación de los productos almacenados y la solicitud del material fungible con la antelación adecuada.

Es responsabilidad del responsable del área, la visualización de las extensiones y la identificación de las microfilarias en cada caso, así como la emisión y comunicación de los resultados negativos, positivos o dudosos, la investigación de las causas de error y la adopción de medidas correctoras. También debe encargarse de que los resultados positivos sean conocidos de forma fehaciente por el médico responsable del paciente.

Las solicitudes urgentes durante las guardias se atenderán siguiendo los procedimientos previstos para estas situaciones.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

El reconocimiento de la presencia de filarias y la discriminación entre especies requiere de cierta experiencia. Las infecciones por más de una especie no son excepcionales en alguna zona geográfica.

La incorrecta realización de la tinción o el examen de las extensiones teñidas por otros procedimientos pueden inducir a error, ya que, por ejemplo, puede no teñirse la vaina de las microfilarias.

Algunas especies de filarias tienen una periodicidad circadiana, por lo que es recomendable procesar la sangre recogida en diferentes momentos del día.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Examen de filarias en sangre	PNT-PI-05	
		Edición N°2	Página 6 de 6

Procedimientos alternativos:

Existen técnicas de detección de antígeno (para filarias linfáticas), de anticuerpos y PCRs específicas, que se pueden solicitar al Centro Nacional de Microbiología correspondiente si se considera necesario.

Existen otros métodos para concentrar la sangre como la filtración de la sangre a través de un filtro de un diámetro adecuado (3-5 micras), que retendrá las filarias y dejará pasar hematíes, plaquetas y leucocitos. Posteriormente se observa la membrana del filtro al microscopio (ver Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 35; PNT-PI-05, primera edición, 2009).

Tiempo de entrega del resultado:

Como las filariasis son infecciones crónicas no se suele considerar una urgencia diagnóstica ni terapéutica. Todo el proceso puede realizarse en menos de 3 horas.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- La prueba puede ser negativa, pero eso no excluye la parasitación por una filaria ante una historia compatible. Si la sospecha es alta deben de solicitarse nuevas muestras y/o solicitar una PCR al Centro Nacional de Microbiología.
- Es importante recordar que hay especies de filarias que no se pueden diagnosticar en una muestra de sangre, ya que sólo se encuentran en tejido cutáneo (*Onchocerca* spp., por ejemplo).
- En algunos pacientes con microfilaremia indetectable, se ha empleado el test de Mazzoti (ver documento científico de este procedimiento).
- La toma de antimaláricos y algunos antihelmínticos podrían enmascarar el diagnóstico.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Akue JP, Rush E, Assengone E, Dieki R. Loa loa infection detection using biomarkers: current perspectives. Res Rep Trop Med 2018; 9:43–48.
2. Burbelo PD, Ramanathan R, Klion AD, Iadarola MJ, Nutman TB. Rapid, novel, specific, high-throughput assay for diagnosis of Loa loa infection. J Clin Microbiol. 2008; 46:2298–2304.
3. Drame PM, Fink DL, Kamgno J, Herrick JA, Nutman TB. Loop-mediated isothermal amplification for rapid and semiquantitative detection of Loa loa infection. J Clin Microbiol. 2014; 52:2071–2077.
4. Drame PM, Meng Z, Bennuru S, Herrick JA, Veenstra TD, Nutman TB. Identification and validation of Loa loa microfilaria-specific biomarkers: a rational design approach using proteomics and novel immunoassays. mBio. 2016; 7(1): e02132-15.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Prueba de migración-cultivo de larvas de nematodos	PNT-PI-06	
		Edición N° 2	Página 1 de 6

PNT-PI-06

Prueba de migración-cultivo de larvas de nematodos

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2009	Edición inicial
02	2020	Segunda edición (actualización del PNT-PI-06 del Procedimiento SEIMC n° 35, publicado en 2009)

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Prueba de migración-cultivo de larvas de nematodos	PNT-PI-06	
		Edición N° 02	Página 2 de 6

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del este documento es describir el procedimiento de detección de *Leishmania* spp. en muestras clínicas mediante tinción y cultivo.

Es un documento de consulta para el personal del laboratorio encargado de su realización e interpretación.

2. FUNDAMENTO

El diagnóstico de *Strongyloides stercoralis* se basa en la detección de sus larvas en heces, pero salvo en casos de hiperinfestación se suelen eliminar en escasa cantidad y esporádicamente, por lo que la sensibilidad de los procedimientos habituales de concentración es muy baja.

Se han diseñado diversos métodos que mejoran la rentabilidad diagnóstica de los exámenes microscópicos de las heces tras procedimientos convencionales de concentración. Todos ellos aprovechan la tendencia natural de *Strongyloides* spp. a migrar fuera de las heces y su capacidad de realizar su ciclo biológico completo fuera de un hospedador como geohelminto de vida libre.

Es recomendable realizarlo especialmente en pacientes procedentes de áreas endémicas con eosinofilia o que vayan a recibir tratamiento inmunosupresor.

Es imprescindible que las heces sean recientes, sin conservantes y sin refrigerar. En todos los casos hay que manejar las muestras y cultivos con precaución, en campana y siempre con guantes, debido a la posible presencia de larvas filariformes, infectivas a través de la piel y a la presencia de posibles microorganismos patógenos.

Estos métodos son útiles también para detectar bajas parasitaciones por uncinarias y *Trichostrongylus* spp. El método de cultivo en placa de agar es el que ha demostrado una mayor sensibilidad.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Alados Arboledas JC, Gómez García de la Pedrosa E, Leiva León J, Pérez Sáenz JL, Rojo Molinero E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. 10a. Pérez Sáenz JL (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2014.

Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia10a.pdf>

- García-Lechuz Moya JM, González López JJ, Orta Mira N, Sánchez Romero MI. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero MI (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017.

Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1b.pdf>

- Manual de gestión de residuos del laboratorio.

- Atlas de parasitología del laboratorio.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Prueba de migración-cultivo de larvas de nematodos	PNT-PI-06	
		Edición N° 02	Página 3 de 8

4. MUESTRAS

4.1. VOLANTE DE PETICIÓN O REGISTRO INFORMÁTICO

Debe acompañar a cada muestra y en él deberán indicarse los datos del paciente, del médico solicitante, del servicio o consulta, así como el país de origen o países visitados, y si existe o no eosinofilia.

4.2. MUESTRA

Se recogerán muestras de heces, el número ideal es de tres, recogidas en días alternos. Se deben entregar diariamente sin conservantes y sin refrigerar ya que en ambos casos se afecta la viabilidad de las larvas.

4.3. CAUSAS DE RECHAZO

- Muestras mal identificadas
- Muestras en recipientes con conservantes
- Muestras refrigeradas
- Recipientes demasiado llenos, muestras fermentadas
- Muestras derramadas
- Muestras escasas y secas
- Muestras de pacientes en tratamiento antihelmíntico

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

Medios de cultivo:

- Agar sangre
- Agar chocolate
- Agar Levine o MacConkey
- Agar nutritivo (1,5% agar, 0,5% de extracto de carne, 1% de peptona, 0,5% NaCl)

Reactivos y productos:

- Formol al 10%

6. APARATOS Y MATERIALES

- Guantes
- Papel de celofán o “parafilm/nescofilm”
- Pinzas
- Pipetas Pasteur
- Tubos de centrifuga
- Centrifuga
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Microscopio
- Campana

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Prueba de migración-cultivo de larvas de nematodos	PNT-PI-06	
		Edición N° 02	Página 4 de 6

7. PROCEDIMIENTO

- 1.- Trabajar en campana y utilizar siempre guantes.
- 2.- Examinar las placas para comprobar que no estén secas ni tengan agua en la superficie.
- 3.- Colocar aproximadamente 2 g de heces en el centro de la placa de agar.
- 4.- Tapar y sellar la placa con papel celo o "parafilm/nescofilm".
- 5.- Incubar la placa, con la tapa hacia arriba, a 28- 30°C durante una semana.
- 6.- Examinar diariamente la placa. Las larvas avanzan por la superficie del agar y arrastran las bacterias presentes en las heces con lo que se observa un rastro de colonias bacterianas.
- 7.- Calentar las pinzas y hacer un agujero en la tapa de la placa.
- 8.- Con una pipeta Pasteur introducir 10 ml de formol al 10%, cubriendo la superficie del agar. Dejarlo actuar durante 30 minutos.
- 9.- Quitar la tapa. Pasar un asa de cultivo por toda la superficie, excepto donde están depositadas las heces. Echar el formol a un tubo de centrifuga por medio de un embudo.
- 10.- Centrifugar 5 minutos a 500 xg.
- 11.- Observar el sedimento al microscopio, buscando la presencia de larvas con el objetivo de 10x, confirmar la identificación con el objetivo de 40x.
- 12.- Las larvas rabditiformes se diferencian en función del tamaño de la cavidad bucal, del primordio genital y del esófago. Las larvas filariformes en función del extremo caudal.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Se pueden observar larvas de nematodos, de *Strongyloides stercoralis*, uncinarias (*Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*) o *Trichostrongylus* spp. Si hay larvas de *Strongyloides* spp. después de varios días de incubación se pueden recuperar también adultos y larvas de vida libre.

Los resultados se informarán como negativo: "No se observan larvas por cultivo en agar" o como positivo (se debe indicar el tipo de larvas detectadas): ejemplo, "Se observan larvas de *Strongyloides stercoralis* mediante cultivo en agar".

9. RESPONSABILIDADES

Es responsabilidad del equipo de atención al paciente:

- 1.- La sospecha de infección o en su caso la cumplimentación de los protocolos de despistaje de infección en las situaciones en las que proceda.
- 2.- La adecuada tramitación de la solicitud, y la correcta recogida identificación y envío de la muestra.

Es responsabilidad del equipo del área de recepción de muestras:

- 1.- Informar sobre cómo deben recogerse y enviarse las muestras al laboratorio.
- 2.- El rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas y la adopción de las correspondientes medidas correctoras.
- 3.- La recepción de la muestra con su volante correspondiente y su identificación.
- 4.- Avisar de forma inmediata al área de parasitología cuando se reciba la muestra para su inmediato procesamiento.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Prueba de migración-cultivo de larvas de nematodos	PNT-PI-06	
		Edición N° 02	Página 5 de 6

Es responsabilidad del personal de secretaría la correcta transcripción de la información que manejen y de mantener la confidencialidad de esta.

Es responsabilidad del equipo del área gestión de calidad la recepción e introducción de los controles de calidad externos.

Es responsabilidad del técnico encargado del procesamiento de muestras para parásitos:

- 1.- El procesamiento y el examen de las extensiones.
- 2.- El registro y la emisión de resultados.
- 3.- La preparación de los reactivos, la rotación de los productos almacenados y la solicitud del material fungible con la antelación adecuada.

Es responsabilidad del responsable del área la supervisión de los resultados negativos, positivos o dudosos, la validación y firma de los informes de resultados, la investigación de las causas de error y la adopción de medidas correctoras. También debe encargarse de que los resultados positivos sean conocidos de forma fehaciente por el médico responsable del paciente. Esto último de forma especialmente urgente si se sospecha que el paciente está inmunodeprimido o puede estarlo en un futuro (trasplante, infección por el VIH, tratamiento esteroideo, etc.). El responsable podrá reasignar temporalmente alguna de estas funciones a otro personal con cualificación suficiente.

Las solicitudes urgentes durante las guardias se atenderán siguiendo los procedimientos previstos para estas situaciones.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Siempre es necesario trabajar en campana y utilizar guantes durante todo el procedimiento ya que puede haber larvas infectivas a partir del primer o segundo día, o incluso al manipular las heces.

Hay que recordar que las larvas infectivas penetran activamente a través de la piel intacta y tener especial cuidado una vez retirada la tapa de la placa de cultivo.

Para detectar larvas con este método es necesario que sean viables. Si la muestra no es reciente las larvas pueden haber muerto y dar lugar a falsos negativos.

Las larvas son sensibles a las bajas temperaturas por lo que es necesario que las muestras permanezcan a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

La utilización de conservantes mata a las larvas, por lo que las muestras con formol, SAF, etc. no se deben utilizar para esta técnica.

No utilizar muestras de pacientes en tratamiento antihelmíntico o que hayan recibido papilla de bario en los días previos.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Un resultado negativo no excluye la parasitación por *Strongyloides stercoralis*, uncinarias (*Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*) o *Trichostrongylus* spp. Es recomendable estudiar al menos 3 muestras.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Prueba de migración-cultivo de larvas de nematodos	PNT-PI-06	
		Edición N° 02	Página 6 de 6

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Garcia LS. Diagnostic Medical Parasitology. 5ª Edición, ASM Press Washington, D.C. 2007.
2. Hirata T, Nakamura H, Kinjo N, Hokama A, Kinjo F, Yamane N, Fujita J. Short report: increased detection rate of Strongyloides stercoralis by repeated stool examinations using the agar plate culture method. Am J Trop Med Hyg 2007; 77:683-684.
3. Siddiqui AA, Berk L. Diagnosis of Strongyloides stercoralis Infection. Clin Infect Dis 2001; 33:1040-1047.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimiento integral para el diagnóstico de malaria	PNT-PI-07	
		Edición N° 1	Página 1 de 8

PNT-PI-07

Procedimiento integral para el diagnóstico de malaria

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2020	Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimiento integral para el diagnóstico de malaria	PNT-PI-07	
		Edición N° 01	Página 2 de 8

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El diagnóstico de laboratorio de la malaria se basa en tests rápidos de detección de antígeno, en la observación microscópica de la gota gruesa y de la extensión fina tras su tinción con Giemsa y en la detección del ADN del parásito mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (PCR).

El objetivo del presente documento es describir el proceso a seguir para el diagnóstico de la infección por las especies de *Plasmodium* que causan enfermedad en el hombre mediante la combinación de métodos de detección rápida de antígeno (RDT), microscopía y PCR. En el presente documento se describe el procesamiento según uno de los tests de detección de antígeno comercializados en España, así como con la utilización de una PCR comercial. Los usuarios de otros productos comerciales deberán introducir las modificaciones necesarias. Este procedimiento se aplica a las muestras indicadas en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Analito y técnicas utilizadas para el diagnóstico de malaria

Analito	Técnica	Tipo de muestra primaria
Detección de antígeno HRP-2 y aldolasa mediante RDT (<i>rapid diagnostic test</i>)	BinaxNOW® Malaria	Sangre total o sangre de punción capilar
Detección del parásito mediante gota gruesa	Tinción Giemsa y microscopía	Sangre total o sangre de punción capilar
Identificación de la especie y cuantificación de la parasitemia mediante extensión fina	Tinción Giemsa y microscopía	Sangre total o sangre de punción capilar
Detección de ADN de <i>Plasmodium</i> spp. mediante PCR (<i>Plasmodium</i> spp.)	RealStar® Plasmodium spp. PCR kit 1.0	Sangre total
Diferenciación de especies de <i>Plasmodium</i> mediante PCR (<i>Plasmodium</i> dif.)	RealStar® Plasmodium dif. PCR kit 1.0	Sangre total

2. FUNDAMENTO

Este método diagnóstico (RDT, gota gruesa, extensión fina y PCRs) se eligió en base a las siguientes ventajas:

- Sensibilidad: la combinación de técnicas (detección de antígeno, microscopía y detección de ADN) permite alcanzar la máxima sensibilidad diagnóstica.
- Rapidez: el RDT (mediante inmunocromatografía) proporciona un resultado en 15 minutos, la gota gruesa y la extensión fina en 45 minutos y la PCR en aproximadamente 3 horas. Se puede comunicar el resultado de todas las técnicas a lo largo de una jornada laboral.
- Cuantificación: la visualización de la extensión fina permite estimar la cifra de hematíes parasitados, algo que va a ser útil tanto en la elección de la pauta terapéutica como en el seguimiento de laboratorio de los pacientes.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimiento integral para el diagnóstico de malaria	PNT-PI-07	
		Edición N° 01	Página 3 de 8

- Diagnóstico de pacientes con malaria submicroscópica: la PCR puede detectar parasitemias en pacientes con gota gruesa negativa.
- Diferenciación de especies: la PCR permite confirmar la identificación de la/s especie/s observada/s mediante microscopía, así como detectar especies no observadas en la visualización de la extensión fina.

Todo ello se realiza para optimizar recursos y para beneficio del diagnóstico clínico.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Alados Arboledas JC, Gómez García de la Pedrosa E, Leiva León J, Pérez Sáenz JL, Rojo Molinero E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. 10a. Pérez Sáenz JL (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2014.

Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia10a.pdf>

4. MUESTRAS

El tipo de muestra a la que aplica este procedimiento es sangre total anticoagulada con EDTA. Son aptos para su utilización en el procedimiento tanto tubos de 5 ml como de 10 ml.

En casos concretos se puede utilizar la sangre de punción digital para realizar el RDT, la gota gruesa y la extensión fina.

- Conservación y almacenamiento de las muestras:

Las muestras de sangre total en EDTA se almacenarán entre 2°C y 8°C durante al menos 2 semanas. Todos los eluidos de ADN se conservarán congelados a -40°C durante 6 meses.

- Criterios de aceptación y rechazo de muestras:

Se rechazarán aquellas muestras con petición de "*Plasmodium* gota gruesa" que:

- No estén bien identificadas.
- No lleven una petición asociada en el SIL.
- No contengan suficiente cantidad de muestra.
- El tipo de muestra enviado no sea el indicado para el procedimiento.
- No proceda el diagnóstico de malaria por ausencia de antecedentes epidemiológicos.

Se deben procesar las muestras lo antes posibles desde su recepción, si no pueden observarse las extensiones en ese momento se recomienda dejarlas preparadas para su tinción y visualización posterior. Toda sospecha de malaria se considerará urgente y se procesará como tal.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimiento integral para el diagnóstico de malaria	PNT-PI-07	
		Edición N° 01	Página 4 de 8

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

En la **tabla 2** se indican los reactivos que se utilizan en el procedimiento y su temperatura de conservación, y el material fungible empleado

Tabla 2. Reactivos y material fungible

DESCRIPCIÓN	CONSERVACIÓN
Reactivos extracción MagCore (102)	Temperatura ambiente
Reactivo detección PCR tiempo real <i>Plasmodium</i> spp.	-20°C
Reactivo detección PCR tiempo real <i>Plasmodium</i> dif.	-20°C
Reactivo Giemsa	Temperatura ambiente
Metanol	
Puntas de pipeta 1 ml	Temperatura ambiente
Puntas de pipeta 1 ml	
Puntas de pipeta 200 µl	
Portaobjetos desechables	
Tiras de pocillos para PCR	
Tapones para pocillos	
Bolsas de basura	
Tubo eppendorff 2 ml	
Eppendorf eluido	
Tubo muestra	
Puntas MagCore	

6. APARATOS Y MATERIALES

Tabla 3. Equipos utilizados en el procedimiento

Nombre	Rango/Precisión
Cabina flujo laminar	No aplica
Nevera	0-8°C
Congelador	-18°C a -24°C
MagCore	No aplica
CFX96	No aplica
Vortex	No aplica
Pipeta	200-1000 µL
Pipeta	20-200 µL

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimiento integral para el diagnóstico de malaria	PNT-PI-07	
		Edición N° 01	Página 5 de 8

7. PROCEDIMIENTO

Preparación de las muestras y registro de peticiones

Comprobación de la petición y del número de identificación de la muestra. Si en el registro solo figura “*Plasmodium*: Gota gruesa”, añadir “*Plasmodium*: detección de antígeno” y “*Plasmodium*: PCR” (si procede).

Esquema de trabajo

Primero se realizarán simultáneamente el RDT (ver PNT-PI-02 de este procedimiento), la gota gruesa (2 portas) y la extensión fina (2 portas) (ver PNT-PI-01 de este procedimiento). Tras la observación del resultado del RDT, y la visualización microscópica de la gota gruesa y de la extensión fina se procederá a informar los resultados a través del SIL y telefónicamente al clínico solicitante. Posteriormente se realizará la extracción de ADN, si procede (en el caso de que alguna de las pruebas anteriores haya resultado positiva, o bien si siendo todos los anteriores test negativos, el cuadro clínico sea sugestivo de malaria). Tras la extracción se realizarán las PCRs:

- RealStar® Malaria PCR Kit 1.0: Detección de *Plasmodium* spp. Se realizará a todos aquellos pacientes con RDT y/o gota gruesa y/o extensión fina negativas, pero con alta sospecha clínica de malaria y antecedente epidemiológico.

- RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0: Detección y diferenciación de las 5 especies de *Plasmodium*. Se realizará a aquellos pacientes con RDT y/o gota gruesa y/o extensión fina negativas y PCR *Plasmodium* spp. (RealStar® Malaria PCR Kit 1.0) positiva o bien a pacientes con RDT y/o gota gruesa y/o extensión fina positiva.

Tras la realización de la/s PCR se analizarán los datos obtenidos mediante el software Bio-Rad CFX Manager IVD Edición 1.6 y se informarán los resultados, manualmente a través del SIL y telefónicamente al clínico solicitante.

En el siguiente esquema (**Figura 1**) se presenta el algoritmo de trabajo propuesto para el diagnóstico integral de la malaria:

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimiento integral para el diagnóstico de malaria	PNT-PI-07	
		Edición N° 01	Página 6 de 8

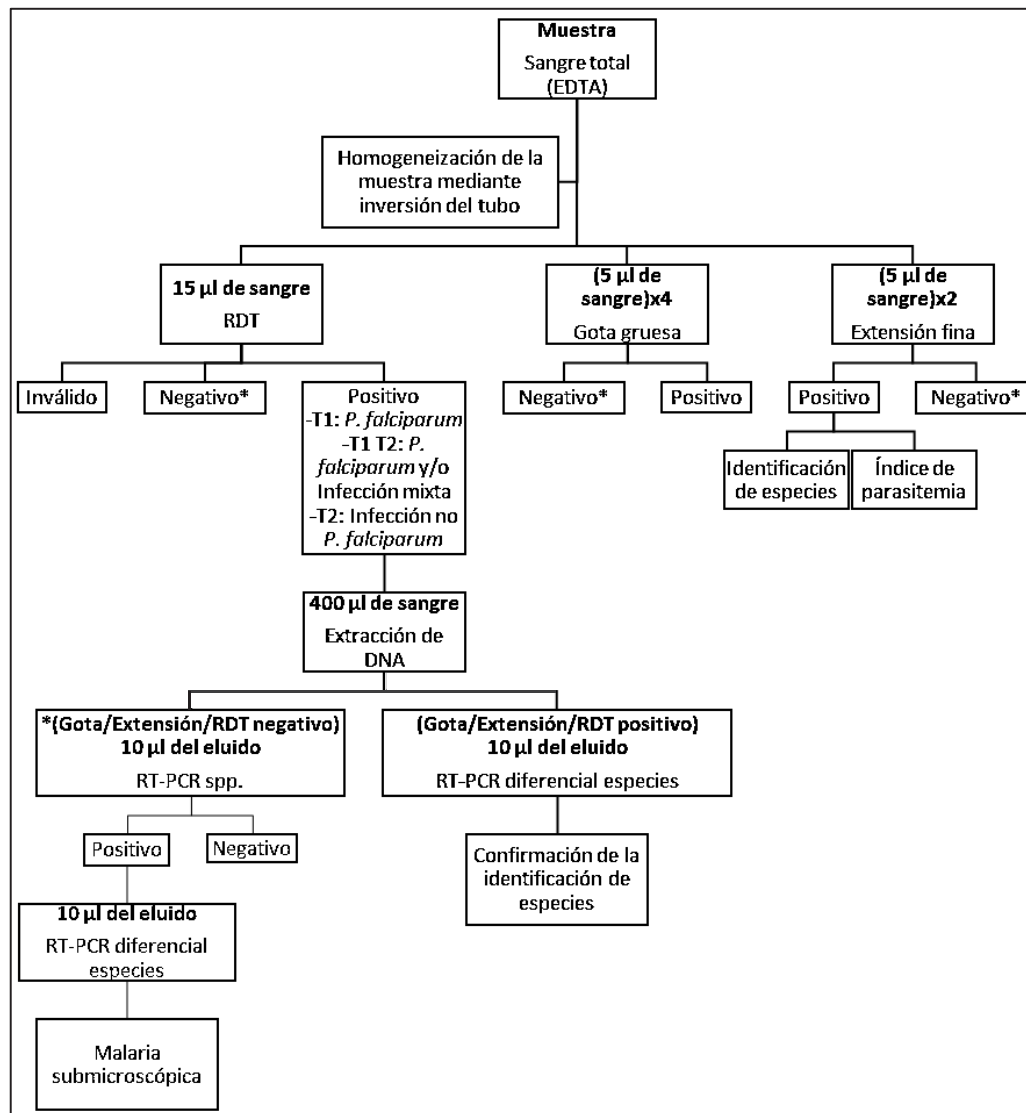


Figura 1. Algoritmo de trabajo para el diagnóstico integral de malaria.

*En RDT/gota gruesa/extensión negativa, alta sospecha clínica, antecedente epidemiológico y estancia en España inferior a 5 años se realizará la PCR de *Plasmodium* spp. por si se tratara de una malaria submicroscópica.

• Aseguramiento interno de la calidad: controles del ensayo

Cada vez que se abra una nueva caja de RDT, se realizará un test con un control positivo para confirmar el buen funcionamiento de la misma. Si la caja de reactivos no incluye muestras de control se guardarán alícuotas de una muestra positiva y se congelarán para su posterior uso.

Periódicamente se incluirán controles positivos abiertos y ciegos para el personal responsable de ver la gota gruesa y el frotis, estableciendo las medidas correctoras correspondientes si se observa un error en los resultados.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimiento integral para el diagnóstico de malaria	PNT-PI-07	
		Edición N° 01	Página 7 de 8

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Para evaluar los resultados obtenidos, el primer paso es la comprobación de que los controles de las distintas pruebas son correctos (línea control del RDT, controles internos, positivos y negativos de las PCRs). Posteriormente se realizará el análisis de los resultados de acuerdo con la interpretación para cada una de las distintas técnicas. En la **Tabla 4** se muestra la interpretación diagnóstica de las distintas combinaciones de resultados de las técnicas.

Tabla 4. Interpretación de los resultados de las distintas pruebas diagnósticas (RDT, gota gruesa, extensión fina y PCR)

RDT	Gota gruesa/ Extensión fina	PCR	Interpretación diagnóstica
Positivo	Positivo	Positivo	Malaria microscópica, recomendable tratamiento y seguimiento con gota gruesa hasta negativización de esta.
Negativo	Positivo	Positivo	Posible falso negativo del RDT (<i>Plasmodium no falciparum</i> , <i>P. falciparum</i> con mutación de la HRP-2, parasitemias muy bajas)
Negativo/Positivo	Negativo	Positivo	Malaria submicroscópica, recomendable tratamiento y seguimiento con gota gruesa y PCR; o malaria en resolución espontánea o malaria en resolución tras tratamiento.
Negativo	Negativo	Negativo	Se descarta la infección por <i>Plasmodium</i> spp. Si sospecha clínica alta se recomienda remitir hasta 3 muestras de sangre.
Negativo/Positivo	Positivo	Negativo	Posible falso negativo de la PCR por cambio de muestras o falso positivo de la gota gruesa (repetir PCR y visualización de la gota y solicitar nueva muestra)
Positivo	Negativo	Negativo	Posible falso positivo del RDT, solicitar nueva muestra y repetir diagnóstico.

9. RESPONSABILIDADES

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista responsable del Laboratorio.

Técnico Especialista de Laboratorio (TEL)

- Recepción de las muestras.
- Preparación y conservación de las muestras.
- Ejecución del procedimiento (excepto la visualización de la gota gruesa y la extensión fina, la interpretación de los resultados del RDT y de las PCR).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimiento integral para el diagnóstico de malaria	PNT-PI-07	
		Edición N° 01	Página 8 de 8

- Archivo de los registros del análisis.

Facultativo Especialista en Microbiología

- Responder a las consultas del personal técnico cualificado.
- Visualización de la gota gruesa y extensión fina.
- Revisión e interpretación de los resultados del RDT y de las PCR.
- Aprobación de los informes de resultados.
- Validación de los resultados.
- Interlocución con los facultativos especialistas peticionarios.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

El RDT debe realizarse sólo en el diagnóstico de pacientes sintomáticos. No debe realizarse en pacientes asintomáticos ni en el cribado en donantes de sangre. Tampoco debe usarse como control postratamiento, ya que el antígeno puede persistir positivo hasta 4 semanas tras un tratamiento eficaz (fundamentalmente el antígeno específico de *P. falciparum*: HPR2).

Se debe realizar un aseguramiento externo de la calidad mediante estudios de control de calidad externos a los que esté adscrito el laboratorio y se realizarán según las instrucciones de los mismos.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Si la visualización microscópica (gota gruesa/frotis) es negativa y la sospecha clínica es alta, se deben solicitar nuevas muestras cada 12/24 horas si no es posible hacer una PCR en ese momento. En casos graves, evaluar la posibilidad de dar tratamiento empírico. La toma de antimaláricos previa (quimioprofilaxis) o de algunos antibióticos (quinolonas, tetraciclinas) pueden negativizar temporalmente la gota gruesa. En algunas malaras graves o en la mujer embarazada el secuestro capilar de los hematíes parasitados puede dar lugar a falsos negativos.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Mathison BA, Pritt BS. Update on malaria diagnostics and test utilization. J Clin Microbiol. 2017; 55:2009-17.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de ADN de <i>Trypanosoma cruzi</i> mediante PCR	PNT-PI-08	
		Edición N° 1	Página 1 de 10

PNT-PI-08

Detección de ADN de *Trypanosoma cruzi* mediante PCR

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2020	Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de ADN de <i>Trypanosoma cruzi</i> mediante PCR	PNT-PI-08	
		Edición N° 01	Página 2 de 10

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

En este procedimiento se describe el método a seguir para detectar el ADN de *Trypanosoma cruzi* presente en muestras de sangre mediante PCR de una secuencia repetida del ADN satélite y/o la secuencia variable del minicírculo de kDNA de *Trypanosoma cruzi*.

2. FUNDAMENTO

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas. Esta infección es predominantemente importada, ya que su transmisión es activa en Latinoamérica (exceptuando el Caribe), especialmente en los países donde el vector aún no ha sido controlado. Como también se transmite de una madre infectada a su hijo (transmisión congénita), la enfermedad de Chagas, se ha constituido en una infección parasitaria autóctona. Además, es importante tener en cuenta que *T. cruzi* puede ser transmitido por transfusión sanguínea, trasplante de órganos y accidentes de laboratorio.

La infección por *T. cruzi* tiene dos fases de evolución que condicionan el diagnóstico de laboratorio, en la primera, la fase aguda, la parasitemia es elevada, en cambio en la fase crónica, la circulación de los parásitos está controlada por la respuesta inmune celular y humoral.

Si bien el movimiento de los tripomastigotes es muy característico y permite hacer un diagnóstico en menos de 30 minutos, la visualización de los parásitos no siempre es posible, si la muestra no se examina dentro de las 12 horas posteriores a su toma.

Por ello, la PCR se constituye en la herramienta de elección para el diagnóstico de la infección congénita, especialmente en los primeros meses de vida, cuando los anticuerpos maternos aún están presentes y en el seguimiento post-tratamiento como marcador de fracaso terapéutico.

Diferentes estudios han demostrado que dos dianas del genoma de *T. cruzi* son útiles para el diagnóstico: el ADN satélite y el minicírculo del kDNA. En este procedimiento se describe la versión de la PCR a tiempo real de la primera opción y la versión convencional de la segunda.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Alados Arboledas JC, Gómez García de la Pedrosa E, Leiva León J, Pérez Sáenz JL, Rojo Molinero E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. 10a. Pérez Sáenz JL (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2014.

Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia10a.pdf>

- García-Lechuz Moya JM, González López JJ, Orta Mira N, Sánchez Romero MI. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero MI (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017.

Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1b.pdf>

- Manual de instrucciones del kit High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de ADN de <i>Trypanosoma cruzi</i> mediante PCR	PNT-PI-08	
		Edición N° 01	Página 3 de 10

4. MUESTRAS

4.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Según las recomendaciones establecidas por los propios centros.

Son muestras aceptables: sangre periférica recogida en anticoagulante EDTA. Sólo en recién nacidos se puede procesar suero o plasma. En cuadros clínicos de afectación neuronal, se puede analizar LCR. En seguimientos post-trasplante se pueden analizar biopsias de tejidos.

4.2. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

Las muestras se pueden enviar a temperatura ambiente, se pueden procesar de forma inmediata o conservar a 4°C hasta su procesamiento.

4.3. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

En el caso de adultos, se rechazarán las muestras de plasma. Los parásitos tienen una densidad parecida a la de los leucocitos, si se eliminan las células sanguíneas también se eliminan a los parásitos. Mediante PCR se puede analizar todo tipo de muestras, simplemente se debe adecuar la extracción de ADN según las características de la muestra. Su utilidad dependerá de las circunstancias clínicas del paciente. Es decir, por ejemplo, si existe un chagoma cerebral, el líquido cefalorraquídeo es una muestra idónea que se debe valorar.

5. REACTIVOS

5.1. BUFFER PARA PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE SANGRE (Guanidina 6 M / EDTA 0,2 M pH 8):

- NaOH (40 g/mol)
- EDTA (372,24 g/mol, E-5134 SIGMA)
- Guanidina-HCl (895,53 g/mol, G-3272 SIGMA)
- H₂O libre de nucleasas grado biología molecular

Disolver 20 g de NaOH en 800 mL de agua, luego añadir 148,90 g de EDTA, para favorecer su disolución, calentar a 50°C. Una vez disuelto el EDTA, añadir 1146,3 g de guanidina. Es una reacción endotérmica, al terminar la adición de la guanidina, se debe apagar el calentador. Verificar y ajustar el pH a 8. Añadir entre 100 a 200 mL de agua para alcanzar el volumen final de 2 litros. Mezclar bien y distribuir en frascos de 500 mL. Conservar a temperatura ambiente, protegidos de la luz.

5.2. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

- *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Diagnostics) o cualquier otro método manual de características similares.
- Sistemas automatizados basados en partículas magnéticas como el *QIA Symphony DSP DNA Midi Kit*, *Maxwell® 16 Blood DNA Purification Kit* o similares.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de ADN de <i>Trypanosoma cruzi</i> mediante PCR	PNT-PI-08	
		Edición N° 01	Página 4 de 10

5.3. REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN *in-house*

5.3.1. PCR A TIEMPO REAL BASADO EN LA AMPLIFICACIÓN DEL ADN SATÉLITE (Sat-qPCR)

- FastStart Universal Probe Master Mix (Roche Diagnostics, Alemania) (2X)
- Oligo F, *Cruzi* 1 (10 µM): ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA
- Oligo R, *Cruzi* 2 (10 µM): AATTCCTCCAAGCAGCGGATA
- Sonda, *Cruzi* 3 (5 µM): FAM-CACACACTGGACACCAA-NFQ-MGB
- Control interno: Human RNaseP TaqMan RNase P Control Reagents Kit (Applied Biosystems) (20x)
- H₂O libre de nucleasas

5.3.2. PCR CONVENCIONAL BASADO EN LA AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN VARIABLE DEL MINICÍRCULO DEL kDNA (kDNA-PCR, 330 pb)

- BIOTOOLS 10x Standard Reaction Buffer with MgCl₂
- dNTPs 25 mM
- Oligo Tc, 121 (200 ng/µL): AAA TAATGTACGGGKGAGATGCATGA
- Oligo Tc, 122 (200 ng/µL): GGTTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA
- Enzima Tth BIOTOOLS 1 U/µL
- Oligo control interno, gen 18S rRNA humano, HuF (12,5 µM): GACGGTATCTGATCGTCTTC
- Oligo control interno, gen 18S rRNA humano, Rev (12,5 µM): GAGCCGCCTGGATACCGC
- H₂O libre de nucleasas

Los iniciadores/sonda se preparan en solución *stock* 10x (100 µM o 2 µg/µL) a partir del liofilizado.

Los iniciadores liofilizados, la solución stock de iniciadores y las alícuotas de trabajo se deben conservar a -20°C en el congelador del área libre de ADN o zona limpia del laboratorio de diagnóstico molecular, durante un periodo no superior a 2 años.

5.4. REACCIONES DE AMPLIFICACIÓN COMERCIALES

Actualmente existen diferentes *kits* comerciales que tienen una sensibilidad similar a la amplificación del ADN satélite. Estos deben utilizarse siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Entre ellos se pueden citar: RealCycler CHAG (Progenie Molecular, Valencia, España), VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection Kit (Certest Biotec S.L., Zaragoza, España), RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 (Altona Diagnostics GmbH, Alemania).

Según las características y condiciones del laboratorio se puede elegir cualquiera de las tres opciones.

5.5. DETECCIÓN DE AMPLICONES

- Agarosa
- TBE 1X
- Agente intercalante GelREd (Biotum)
- Buffer de carga 10x
- Marcadores de peso molecular de 100 pb o similar
- Agua destilada

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de ADN de <i>Trypanosoma cruzi</i> mediante PCR	PNT-PI-08	
		Edición N° 01	Página 5 de 10

6. APARATOS Y MATERIAL

- Micropipetas (diferentes para cada área de trabajo).
- Puntas de micropipeta de “calidad molecular” con filtro.
- Gradillas para tubos sarstedt o similares.
- Agitador tipo vórtex.
- Tubos de reacción de 1,5 ml de “calidad molecular” (tipo sarstedt).
- Rejillas, bases, tubos de PCR adaptados al termociclador.
- Gradillas de frío
- Contenedores de residuos.
- Cabina de seguridad biológica.
- Termobloques.
- Microcentrífugas.
- Termocicladores.
- Balanza.
- Matraces y probetas.
- Fuente de electroforesis, bandejas y cubetas.
- Horno microondas.
- Sistema de visualización de geles con transiluminador UV.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE SANGRE PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN

1. La muestra de sangre se mezcla volumen a volumen con una solución de guanidina 6M / EDTA 0,2 M pH= 8 en un tubo universal de 50 mL o similar (Avila et al., 1991). Se recomienda usar tubos de 50 mL para que la muestra tenga suficiente distancia con la tapa y así evitar las contaminaciones entre muestra y muestra durante el paso 3.
2. Inmediatamente mezclar, y conservarla a temperatura ambiente en agitación constante (asegurarse de que el color del lisado sea marrón para continuar con el siguiente paso).
3. Someter el tubo a un baño de agua en ebullición durante 15 minutos (Britto et al., 1993).
4. Dejar enfriar y seguir con el proceso de extracción de ADN. Se puede conservar la muestra a temperatura ambiente hasta antes de la extracción.
5. Si la muestra es suero, plasma o LCR se procesa la muestra directamente según las instrucciones del kit de extracción de ADN.
6. Si el volumen de muestra es inferior a 300 µL, se puede extraer el ADN sin tratarla con guanidina 6 M / EDTA 0,2M.
7. Si se trata de una biopsia de tejido, se realiza la digestión con proteinasa K según las instrucciones del kit de extracción de ADN.
8. El procesamiento de las muestras se realizará en cabina de bioseguridad.

7.2. EXTRACCIÓN DEL ADN

1. Si se utilizan columnas, la extracción de ADN se realiza a partir de 300 µL de sangre-guanidina y se recupera el ADN en 100 µL del buffer de elución del *kit*.
2. Si se utilizan sistemas de extracción automatizados, se parte de 400 µL de sangre-guanidina siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de ADN de <i>Trypanosoma cruzi</i> mediante PCR	PNT-PI-08	
		Edición N° 01	Página 6 de 10

Controles:

Por cada 10 muestras procesadas se extraerá el ADN de una muestra negativa y de una muestra positiva, ambas analizadas previamente. Estas muestras sirven respectivamente, de control negativo y control positivo de extracción. También se puede usar como control positivo, una muestra preparada con 10 parásitos/mL.

Tanto muestras como controles se procesan en duplicado.

Las muestras se deben procesar en cabina de bioseguridad. Todas las muestras se deben atemperar antes de su procesamiento.

7.3. AMPLIFICACIÓN

Elegir cualquiera de las tres opciones siguientes.

7.3.1. PCR a tiempo real in-house basado en la amplificación del ADN satélite (Sat-qPCR)

Se utilizará la *master mix* de la siguiente tabla:

Reactivo	x Tubo (µL)	Concentración final
FastStart Universal Probe Master Mix (Roche Diagnostics, Alemania) (2X)	10	1X
Oligo F: Cruzi 1 (10 µM)	1,5	0,75 µM
Oligo R: Cruzi 2 (10 µM)	1,5	0,75 µM
Sonda: Cruzi 3 (5 µM)	0,2	0,05 µM
Human RNaseP TaqMan RNase P Control Reagents Kit (Applied Biosystems)	0,5	0,5x
H ₂ O libre de nucleasas	1,3	
Total (µL)	15	

La reacción se hace en un volumen final de 20 µL y se utiliza 5 µL del ADN tanto de muestras como controles de extracción.

A la hora de preparar las distintas *master mix* se debe considerar, que hay que emplear tantos tubos como muestras se procesen, un control negativo (H₂O libre de nucleasas), un control positivo de alta carga parasitaria, un control positivo de baja carga parasitaria, y un control negativo de ADN humano (controles de amplificación). Los reactivos deben estar descongelados y previamente bien homogenizados.

La preparación de las *master mix* puede realizarse a temperatura ambiente, pero debe utilizarse de forma inmediata (si se tardara en su distribución, la *master mix* debe conservarse en frío, en cajas de congelación, evitando el uso de hielo).

El protocolo de amplificación es el siguiente:

- Primer paso: 10 min a 95°C.
- Segundo paso: 40 ciclos de 15 seg a 95°C y 1 min a 58°C (punto de lectura de la fluorescencia).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de ADN de <i>Trypanosoma cruzi</i> mediante PCR	PNT-PI-08	
		Edición N° 01	Página 7 de 10

7.3.2. PCR convencional in-house basado en la amplificación de la región variable del minicírculo del kDNA (kDNA-PCR, 330 pb)

- Se utilizará la master mix de la siguiente tabla:

Reactivo	x Tubo (µL)	Concentración final
BIOTOOLS 10x Standard Reaction Buffer with MgCl ₂	7,5	1X
dNTPs (25 mM)	0,6	0,2 mM
Oligo: 121 (200 ng/µL)	1	2,7 ng/µL
Oligo: 122 (200 ng/µL)	1	2,7 ng/µL
Enzima Tth BIOTOOLS (1 U/µL)	2	0,03 U/µL
Oligo: HuF (12,5 µM)	0,09	0,015 µM
Oligo: Rev (12,5 µM)	0,45	0,075 µM
H ₂ O libre de nucleasas	42,4	
Total (µL)	55	

A la hora de preparar las distintas *master mix* se debe considerar, que hay que emplear tantos tubos como muestras se procesen, un control negativo (H₂O libre de nucleasas), un control positivo de alta carga parasitaria, un control positivo de baja carga parasitaria, y un control negativo de ADN humano.

Los reactivos deben estar descongelados y previamente bien homogenizados.

La preparación de la *master mix* puede realizarse a temperatura ambiente, pero debe utilizarse de forma inmediata (si se tardara en su distribución, la *master mix* debe conservarse en frío, en cajas de congelación, evitar el uso de hielo).

Se puede utilizar una polimerasa de otra casa comercial. La concentración de magnesio se ajustará en función al tampón que proporcione la casa comercial.

El protocolo de amplificación es de:

Paso 1: Desnaturalización inicial a 95°C, 5 minutos.

Paso 2: Desnaturalización a 94°C, 30 seg; alineación a 64°C, 30 seg; extensión a 72°C, 30 seg, 35 ciclos.

Paso 3: Extensión final a 72°C, 10 min, y mantenimiento final a 4°C, infinito.

7.3.3. PCR A TIEMPO REAL COMERCIAL

Preparar la *master mix* según las indicaciones de los fabricantes.

- Manipular siempre con guantes.
- En los mismos tubos de amplificación añadir 8 µl de buffer de carga 10x.
- Cargar los 25 µl en el gel, incluyendo el marcador de 100 pb en una de las calles.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de ADN de <i>Trypanosoma cruzi</i> mediante PCR	PNT-PI-08	
		Edición N° 01	Página 8 de 10

7.4. DETECCIÓN DE AMPLICONES DE LA PCR CONVENCIONAL

- Preparar un gel de agarosa al 2% en tampón TBE 1X, de tamaño adecuado a la cubeta de electroforesis que se utilice. Añadir GelRed™ (Biotum) a razón de 1 µL por cada 100 mL de tampón TBE 1x.
 - Manipular siempre con guantes.
 - En los mismos tubos de amplificación añadir 8 µl de buffer de carga 10x.
 - Cargar los 25 µl en el gel, incluyendo el marcador de 100 pb en una de las calles.
 - Correr el gel a 150 V hasta que el frente alcance el borde del mismo.
- Visualizar el gel con transiluminador UV.

8. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

8.1. PCR A TIEMPO REAL

Los resultados se expresarán en términos cualitativos de positivo o negativo. Si no amplifica ni la diana ni el control, la reacción no es válida y se debe repetir el procedimiento. La amplificación del control negativo indicaría una contaminación. Esta circunstancia invalida el resultado obtenido y es necesario repetir el procedimiento desde la extracción de ADN.

8.2. PCR CONVENCIONAL

La reacción de PCR es válida si los resultados de los tres controles negativo, positivo y blanco son adecuados.

La extracción del ADN es válida si los controles negativos y positivos de extracción realizados en duplicado dan los resultados esperados.

Una muestra se considera positiva si ambos duplicados presentan una banda del tamaño esperado.

Una muestra se considera negativa si no se observa la banda del tamaño del producto de amplificación de *T. cruzi* y presenta la señal del control interno del tamaño esperado, siempre en ambos duplicados.

Si los duplicados son discordantes con respecto a la señal de *T. cruzi*, se repite la extracción del ADN y se realiza la PCR con 5 y 10 µL de cada uno de los extractos obtenidos.

Si los duplicados son discordantes con respecto a la señal del control interno, o si en ambos duplicados no se observa la señal del control interno, se repite la PCR con 5 y 2,5 µL de muestra. Si aun así no se observa la señal del control interno, se repite la extracción de ADN y se realiza la PCR con 5 y 2,5 µL de cada extracto. Si no se observa la señal del control interno en estos nuevos extractos, se considera que la muestra contiene inhibidores y se solicita una nueva muestra.

Cuando la muestra de partida es suero o LCR, los resultados se validan según la señal de amplificación de *T. cruzi*. El control interno en estas muestras no se visualiza a menos que contengan restos de células nucleadas.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo. El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de Microbiología que los emite.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de ADN de <i>Trypanosoma cruzi</i> mediante PCR	PNT-PI-08	
		Edición N° 01	Página 9 de 10

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

- Todo el personal del laboratorio deberá conocer y seguir las normas generales de bioseguridad e higiene, así como las normas de trabajo en laboratorios de Biología Molecular. Todas las manipulaciones deben realizarse con guantes sin polvo.

- Es importante considerar que para la obtención de resultados correctos en un laboratorio de diagnóstico molecular en el que se realizan técnicas de PCR, se debe distribuir el trabajo en 3 áreas perfectamente diferenciadas:

Área 1 o zona limpia: dedicada a la preparación de reactivos. En la que no se introducirán muestras, ni reactivos que contengan ADN, tanto amplificado como no amplificado. En esta área se preparan las mezclas reacción (*master mix*) de la PCR y se alicuotarán los reactivos de extracción de ADN de las muestras clínicas.

Área 2 o de manipulación de muestras y extracción de ADN. En esta área se procesan las muestras, se realiza la extracción del ADN y se añade el ADN a la *master mix*. En esta zona no se debe introducir ADN amplificado.

Área 3 o de amplificación. En esta área se detectan y procesan los productos de PCR (carga de geles, purificación, etc.).

En cada zona de trabajo debe existir material independiente (puntas de micropipeta, micropipetas, guantes, etc.). No se debe trasladar el material de una zona a otra, salvo el estrictamente necesario. El flujo de trabajo debe ser: área 1→2→3 y nunca a la inversa.

- Es importante que para el manejo del material que esté en contacto con agentes intercalantes, se usen siempre guantes y se extremen las precauciones de seguridad, ya que son reactivos tóxicos. La visualización de geles con transiluminador UV, debe realizarse con caretas protectoras o en sistema cerrado de visualización de geles.

- La carga parasitaria en los niños con infección congénita y los casos agudos generalmente es elevada, por lo que la señal de amplificación es bastante fuerte. En una nueva muestra se suelen observar los tripomastigotes de *T. cruzi*, confirmando así los resultados de la PCR, esto último depende de la experiencia del microscopista.

En los casos de sospecha de infección congénita, si la señal obtenida es débil o se observa en un ciclo tardío, revisar la trazabilidad de la muestra, y asegurarse de que no hubo posibilidad de intercambio de muestra con la de la madre. Las señales débiles son características de una infección crónica. Por ello, ante esta situación se debe realizar un seguimiento exhaustivo para confirmar los resultados obtenidos. Esta consideración se la debe tener presente especialmente cuando se utiliza sangre de cordón umbilical como muestra biológica, ya que su obtención no descarta la posibilidad de contaminación con sangre materna.

- Es recomendable que ante la sospecha de una infección crónica se tomen 5 mL de sangre para mezclarla con el tampón guanidina.

- Si la sospecha es una infección aguda, el volumen de sangre de partida no influye en la eficiencia de la extracción de ADN y de la PCR.

- La muestra de suero es útil sólo en infecciones agudas.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de ADN de <i>Trypanosoma cruzi</i> mediante PCR	PNT-PI-08	
		Edición N° 01	Página 10 de 10

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

En los casos crónicos, el resultado obtenido depende en gran medida del volumen de la muestra remitida, se recomienda un mínimo de 5 mL.

En muestras de recién nacidos se pueden producir inhibiciones de la PCR, que en ocasiones no permiten obtener un resultado y que se detectarán por falta de amplificación del control interno. En estos casos se repetirá de nuevo el procedimiento desde el principio, volviendo a extraer el ADN de la muestra, si fuera posible, o en su caso analizando el mismo ADN y una dilución 1/10 de la misma. Si aun así no se consigue obtener amplificación, el resultado deberá informarse como: "muestra inhibida".

Como cualquier prueba de diagnóstico, el resultado del test deberá siempre correlacionar con los hallazgos clínicos. Los resultados obtenidos se deben interpretar junto con la información clínica del paciente.

Es conveniente validar el procedimiento elegido y someterlo a los controles adecuados en cada laboratorio de Microbiología.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Avila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. Mol. Biochem. Parasitol. 1991; 48:211-221.
2. Britto C, Cardoso MA, Wincker P, Morel CM. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. Mem. Inst.Oswaldo Cruz 1993; 88:171-172.
3. Norman FF, Pérez-Ayala A, Pérez-Molina JA, Flores-Chavez M, Cañavate C, López-Vélez R. Lack of association between blood-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA and cardiac involvement in a non-endemic area. Ann Trop Med Parasitol. 2011; 105:425-430. doi:10.1179/1364859411Y.0000000033
4. Murcia L, Carrilero B, Muñoz MJ, Iborra MA, Segovia M. Usefulness of PCR for monitoring benznidazole response in patients with chronic Chagas' disease: a prospective study in a non-disease-endemic country. J Antimicrob Chemother. 2010; 65:1759-1764. doi:10.1093/jac/dkq201
5. Piron M, Fisa R, Casamitjana N, et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. Acta Trop. 2007;103:195-200. doi:10.1016/j.actatropica.2007.05.019
6. Simón M, Gil-Gallardo LJ, Asunción Iborra M, et al. An observational longitudinal study to evaluate tools and strategies available for the diagnosis of congenital Chagas disease in a non-endemic country. Acta Trop. 2019; 199:105127. doi:10.1016/j.actatropica.2019.105127.
7. Ramírez JC, Cura CI, da Cruz Moreira O, et al. Analytical validation of quantitative real-time PCR methods for quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. J Mol Diagn. 2015; 17:605-615. doi:10.1016/j.jmoldx.2015.04.010.
8. Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, et al. Analytical performance of a multiplex real-time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. PLoS Negl Trop Dis. 2013; 7(1):e2000. doi:10.1371/journal.pntd.0002000.
9. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. PLoS Negl Trop Dis. 2011; 5(1):e931. doi:10.1371/journal.pntd.0000931.