

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

35.

El laboratorio de microbiología ante las enfermedades parasitarias importadas

2 0 0 9

Coordinador: Pablo Martín-Rabadán

Autores: Carmen Cañavate
Juan Cuadros
Rocío Martínez Ruiz
Pablo Martín-Rabadán



ISBN-978-84-613-8234-7

ÍNDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

1. Introducción

2. Consideraciones clínicas

3. Recogida y transporte de muestras clínicas

- 3.1. Heces
- 3.2. Test de Graham (papel celo para *Enterobius vermicularis*)
- 3.3. Gusanos y otros parásitos macroscópicos
- 3.4. Contenido duodenal
- 3.5. Sangre
- 3.6. Suero
- 3.7. Líquido cefalorraquídeo
- 3.8. Muestras de tejido
- 3.9. Orina
- 3.10. Muestras para pruebas de PCR

4. Diagnóstico microbiológico de las parasitosis importadas

- 4.1. Diagnóstico microbiológico de los parásitos intestinales importados
 - 4.1.1. Parasitosis intestinales importadas. Consideraciones diagnósticas generales
 - 4.1.2. Diagnóstico microbiológico de la amebiasis
 - 4.1.3. Diagnóstico microbiológico de la ciclosporiasis
 - 4.1.4. Diagnóstico microbiológico de las helmintiasis
 - 4.1.4.1. Pruebas serológicas para helmintiasis intestinales
 - 4.1.4.2. Helmintos adultos
 - 4.1.4.3. Contenido duodenal
 - 4.1.4.4. Test de Graham
 - 4.1.5. Diagnóstico microbiológico de la estrongiloidiasis
 - 4.1.5.1. Pruebas de migración-cultivo de larvas de *Strongyloides* spp.
 - 4.1.5.2. Serología de *Strongyloides stercoralis*
- 4.2. Diagnóstico de la malaria
 - 4.2.1. Pruebas rápidas para el diagnóstico de la malaria (PRD)
 - 4.2.2. Diagnóstico microscópico
 - 4.2.3. Procedimientos alternativos adicionales
 - 4.2.4. Procedimientos no recomendados
- 4.3. Diagnóstico microbiológico de la leishmaniasis
 - 4.3.1. Consideraciones generales
 - 4.3.2. Diagnóstico de la leishmaniasis mediante exámen microscópico
 - 4.3.3. Cultivo de *Leishmania* spp.
 - 4.3.4. Diagnóstico molecular de la leishmaniasis
 - 4.3.5. Diagnóstico serológico de la leishmaniasis
 - 4.3.6. Métodos de detección de antígeno de *Leishmania* spp.
- 4.4. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana)
 - 4.4.1. Consideraciones generales
 - 4.4.2. Diagnóstico de la tripanosomiasis americana mediante microscopía
 - 4.4.3. Métodos diagnósticos indirectos: xenodiagnóstico y cultivo
 - 4.4.4. Métodos basados en la detección de ácidos nucleicos
 - 4.4.5. Diagnóstico serológico de la tripanosomiasis americana
- 4.5. Diagnóstico de la enfermedad del sueño (tripanosomiasis africana)
 - 4.5.1. Consideraciones generales
 - 4.5.2. Diagnóstico de laboratorio de la tripanosomiasis africana
- 4.6. Diagnóstico de las filarias
 - 4.6.1. Diagnóstico de las filarias linfáticas
 - 4.6.2. Diagnóstico de la oncocerquiasis
 - 4.6.3. Diagnóstico de la loasis
 - 4.6.4. Diagnóstico de la parasitación por *Mansonella* spp.
 - 4.6.5. Diagnóstico de filarias autóctonas de Europa (dirofilarias)
- 4.7. Diagnóstico de la esquistosomiasis
 - 4.7.1. Consideraciones generales
 - 4.7.2. Diagnóstico de laboratorio de la esquistosomiasis urinaria
 - 4.7.3. Diagnóstico de laboratorio de la esquistosomiasis intestinal

4.8. Artrópodos tropicales que parasitan humanos

4.8.1. Miasis

4.8.1.1. Miasis foruncular americana: *Dermatobia hominis*

4.8.1.2. Miasis foruncular africana: *Cordylobia* spp.

4.8.1.3. Otras miasis

4.8.2. Tunguiasis

4.8.3. Pentastomiasis

5. Bibliografía

ÍNDICE DE LOS DOCUMENTOS TÉCNICOS

1. PNT-PI-01. Examen microscópico de sangre para detección de malaria
2. PNT-PI-02. Detección de antígenos de *Plasmodium* spp.
3. PNT-PI-03. Detección de *Trypanosoma* spp. en sangre
4. PNT-PI-04. Detección de *Leishmania* spp. en muestras clínicas
5. PNT-PI-05. Examen de filarias en sangre
6. PNT-PI-06. Prueba de migración-cultivo de larvas de nematodos

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

35. EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA ANTE LAS ENFERMEDADES PARASITARIAS IMPORTADAS. 2009

Coordinador: Pablo Martín-Rabadán

Autores: Carmen Cañavate
Juan Cuadros
Rocío Martínez Ruiz
Pablo Martín-Rabadán

1. INTRODUCCIÓN

Una parasitosis importada es aquella adquirida por el paciente en una zona geográfica distinta del lugar de diagnóstico. Al referirse a ellas como entidad se asume que no es endémica en el área en el que se realiza el diagnóstico o sólo lo es de forma excepcional.

En el caso de las parasitosis intestinales el concepto de "importado" es difícil de aplicar ya que son pocos los parásitos que se pueden considerar estrictamente importados aunque se pueda sospechar este origen al analizar la epidemiología de cada caso concreto. En general, las técnicas de diagnóstico de los parásitos intestinales importados son las mismas que las se emplean para los autóctonos y ya han sido incluidas en el Procedimiento nº 30 dedicado al Diagnóstico Microbiológico de las infecciones gastrointestinales (<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/>) y en los Documentos Técnicos dedicados al Diagnóstico Microbiológico de las infecciones gastrointestinales parasitarias (PNT-GE-03) y a las Técnicas rápidas de diagnóstico de la parasitosis (PNT-TDA-05). En este procedimiento se amplían algunos aspectos del Procedimiento nº 30, revisando aspectos relevantes de las parasitosis intestinales inexistentes o casi erradicadas en España.

Respecto a los parásitos hemáticos, en el presente procedimiento se revisan todos ellos, incluyendo tanto los tropicales como los de zonas templadas (*Babesia* spp.), los erradicados en nuestro país (*Plasmodium* spp.) o los endémicos (*Leishmania* spp.) ya que no han sido incluidos previamente en otros procedimientos. Se ha añadido también un breve texto e imágenes de artrópodos parásitos del hombre de fácil reconocimiento visual y que pueden recibirse en un laboratorio específico de Parasitología Médica.

Respecto a los Documentos técnicos se han incorporado los que precisan de técnicas diagnósticas especiales y que por su importancia o simplicidad deberían estar disponibles en cualquier laboratorio de microbiología. Se han omitido las técnicas parasitológicas no comercializadas, las propias de laboratorios de referencia y las dedicadas a organismos muy infrecuentes.

Las enfermedades parasitarias son por su frecuencia y duración uno de los grupos de enfermedades infecciosas más prevalentes en el mundo. El riesgo que suponen para la salud es enormemente variable dependiendo del organismo y de la inmunidad del hospedador. Así, la malaria causa anualmente de 0,5 a 2 millones de muertes al año, mientras que los parásitos intestinales no suelen ser causa directa de muerte. Las enfermedades parasitarias se distribuyen principalmente en relación a condiciones medioambientales pero su persistencia responde en gran parte a los esfuerzos de erradicación muy relacionados con factores socioeconómicos. Para su control son necesarias extensas campañas y la mejora de las viviendas, de la calidad del agua y de la eliminación de residuos.

Los laboratorios de microbiología diagnóstica de los países desarrollados todavía dependen en gran medida del examen microscópico de las muestras, método de limitada sensibilidad y muy dependiente de la experiencia del microscopista. Los elevados costes y la posible dificultad técnica de las técnicas de PCR hacen que los métodos de detección inmunológica de antígenos parasitarios sean el futuro inmediato tanto en laboratorios como en proyectos de campo.

2. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

La colaboración estrecha entre los facultativos que atienden a viajeros e inmigrantes y los facultativos responsables del laboratorio facilita el alcanzar los objetivos diagnósticos optimizando los recursos. El primero debe facilitar los datos clínicos y epidemiológicos de utilidad diagnóstica y el segundo debe dar a conocer las limitaciones y valores diagnósticos de las técnicas empleadas.

La solicitud de un estudio parasitológico en heces está indicada en cuadros de diarrea prolongada buscando fundamentalmente *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium* spp. y, en casos seleccionados, *Entamoeba histolytica*, *Cyclospora cayetanensis*, *Strongyloides* spp. o *Balantidium coli*. En inmunodeprimidos puede estar indicado buscar *Isospora belli* y microsporidios. El clínico debe estar informado de qué tinciones, pruebas de detección de antígenos o de microbiología molecular realiza su laboratorio de forma sistemática y cuáles sólo cuando se solicitan expresamente. En otras palabras, debe saber hasta qué punto se han buscado o descartado los posibles parásitos sospechados. En algunas situaciones las limitaciones de sensibilidad, de disponibilidad de las pruebas diagnósticas o las consideraciones de coste-eficacia aconsejarán el empleo de tratamientos antiparasitarios empíricos o "ex-juvantibus".

Los helmintos intestinales son frecuentes en expatriados e inmigrantes de zonas tropicales o subdesarrolladas durante el primer año fuera de la zona de alta endemia. Su presencia se puede investigar de forma sistemática o sólo si produce síntomas. En individuos con alta probabilidad de parasitación una alternativa coste-eficaz es realizar tratamiento empírico. Transcurridos varios años fuera de zona endémica los helmintos que se pueden encontrar en heces son principalmente *Strongyloides* y *Schistosoma* que se sospechan combinando datos clínicos y epidemiológicos y se pueden confirmar mediante exámenes parasitológicos y serológicos.

El aumento del número de eosinófilos en sangre, a veces acompañados de lesiones cutáneas, de partes blandas o de órganos internos puede deberse a la infección por parásitos intestinales, siendo raro en protozoos (*Isospora belli*, *Dientamoeba fragilis*) y frecuente en helmintos, en algunos casos limitado a la fase de migración larvaria (*Ascaris* spp.) o de intensidad variable durante toda la infección (*Strongyloides* spp., *Trichuris* spp., uncinarias); a parásitos extraintestinales (filarias, *Paragonimus* spp., *Schistosoma* spp., *Trichinella spiralis*, etc.) o a

la salida de antígenos de formas quísticas de tenias (hidatidosis, cisticercosis). El diagnóstico sindrómico de larva migrans visceral requiere un alto nivel de alerta para su sospecha y su confirmación de laboratorio resulta especialmente compleja ya que normalmente no se puede examinar al organismo causal. En el diagnóstico diferencial se deben incluir *Toxocara* spp., *Ascaris* spp., *Anisakis* spp., *Baylisascaris* spp., *Gnathostoma* spp., *Trichinella* spp., *Loa loa* o *Hypoderma* spp.

Las filariasis humanas son un grupo de parasitosis producidas por nematodos de la familia filarioidea transmitidos por dípteros. Son propias de zonas tropicales y su presencia puede sospecharse en pacientes con antecedentes de exposición en zonas endémicas que presentan hiperesinofilia, edemas localizados, linfedema o prurito cutáneo. Las manifestaciones clínicas pueden tardar años en aparecer.

Respecto a los protozoos hemáticos la malaria se debe descartar en todo paciente febril procedente o visitante de zona endémica. Los pacientes procedentes de zonas endémicas de malaria pueden tener parasitación persistente por malaria sin fiebre. No están claras las consecuencias (positivas o negativas) de esta parasitación para el individuo parasitado pero supone un reto para el control de la enfermedad y para la selección de donantes de sangre. No debe olvidarse a *Babesia* spp. como causa de fiebre y hemólisis en individuos procedentes de los Estados Unidos de Norteamérica y en pacientes esplenectomizados con o sin historia de viajes.

La búsqueda de hemoparásitos en sangre está también indicada en los cuadros de fiebre de origen desconocido en ausencia de exposición a zonas endémicas por la posibilidad (remota pero potencialmente grave) de malaria de aeropuerto, o de adquisición por transfusión de sangre (*Leishmania* spp. y otros), concentrado de hematíes (*Plasmodium* spp. y *Babesia* spp.) o de plaquetas (*Trypanosoma* spp.).

Las formas de presentación de la parasitación por *Leishmania* spp. se pueden dividir en: formas localizadas en piel, invasivas de piel y mucosas y formas generalizadas con afectación del sistema reticuloendotelial. Algunos pacientes que sobreviven a esta última pueden desarrollar recidivas focalizadas en piel o áreas en donde un proceso inflamatorio de cualquier etiología ha reunido leucocitos circulantes parasitados que al romperse liberan los amastigotes que se reproducen localmente (las llamadas leishmaniasis dérmica post-kala-azar y las formas "atípicas" observadas en pacientes infectados por el VIH). La parasitación por *Leishmania* spp. también puede cursar de forma asintomática.

La leishmaniasis cutánea representa el 75% de todos los casos nuevos. Diferentes especies de *Leishmania* pueden infectar los macrófagos en la dermis con presentaciones clínicas y pronóstico variables. *Leishmania* spp. produce lesiones en la piel de zonas expuestas del cuerpo (cara, brazos y

piernas) que causan cicatrices permanentes. La forma habitual es un nódulo que alcanza varios centímetros de diámetro, que a las pocas semanas de la inoculación puede llegar a ulcerarse y que cura de forma espontánea en unos meses. El diagnóstico diferencial incluye principalmente cáncer de piel, infecciones por *Mycobacterium* spp. (*M. tuberculosis*, *M. leprae*, atípicas...), *Nocardia* spp. y hongos (*Blastomyces* spp., *Sporothrix* spp., *Paracoccidioides* spp., etc.).

La forma mucocutánea (LMC) también llamada espundia o gangosa en Sudamérica, aparece meses o años después de un episodio de leishmaniasis cutánea en el 5-15% de los casos. Están originadas por las especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia* (*L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. panamensis*) y destruye las membranas mucosas y cartílagos de la nariz, boca y garganta. Excepcionalmente, las LMC pueden estar causadas por *L. amazonensis*, *L. major*, *L. tropica* y *L. infantum*. Nunca curan espontáneamente, son muy difíciles de tratar, y las infecciones bacterianas secundarias son comunes y potencialmente fatales.

La leishmaniasis visceral o kala-azar, se caracteriza por fiebre irregular, pérdida de peso, hepatomegalia, esplenomegalia y pancitopenia. Según la procedencia geográfica del paciente, se debe establecer el diagnóstico diferencial, entre otros, con malaria, especialmente la forma de síndrome de esplenomegalia tropical, esquistosomiasis, tripanosomiasis africana, mononucleosis, malnutrición, linfoma y leucemia.

La enfermedad de Chagas se debería buscar activamente en todos los individuos procedentes de zonas endémicas y en los hijos de madres procedentes de estas zonas (la tasa de transmisión vertical está entre el 3% y el 10%) ya que el tratamiento en fases precoces cura la enfermedad y en la fase indeterminada (asintomática) reduce el riesgo de enfermedad crónica. Los pacientes con enfermedad crónica no mejoran clínicamente con el tratamiento pero sí está indicado en pacientes que vayan a someterse a un trasplante o a terapia inmunosupresora. En los pacientes con SIDA u otra causa de inmunosupresión, la infección por *T. cruzi* se reactiva, reaparece la parasitemia y pueden producirse lesiones cerebrales semejantes a las de la toxoplasmosis. El despistaje de la enfermedad de Chagas en mujeres embarazadas permite la detección precoz en el recién nacido que debe ser evaluado en repetidas ocasiones durante los 9 a 12 primeros meses de vida. El despistaje serológico es fundamental en donantes de sangre o de órganos. Actualmente en España la legislación lo exige en donantes de sangre procedentes de zonas de riesgo.

La infección por *T. cruzi* se presenta en dos fases: la fase aguda que va desde la inoculación del parásito hasta 1 a 2 meses después, pudiendo ser más prolongada en los casos de transmisión por transfusión sanguínea. Generalmente es asintomática o puede presentar síntomas inespecíficos que a menudo se confunden con un resfriado común. Sólo el 1-5% de los casos

presentan manifestaciones clínicas en forma de miocarditis, hepatoesplenomegalia, meningitis y malestar general. En zonas endémicas, los signos clásicos según la puerta de entrada, son el signo de Romaña y el chagoma de inoculación. Durante esta etapa, la parasitemia es elevada, generalmente disminuye al cabo de unos pocos meses dependiendo de la vía de infección y el tratamiento tripanocida es prácticamente 100% eficaz. El tratamiento específico es obligado en todos los casos de infección congénita, ya que el porcentaje de curación alcanza el 100% en los niños menores de un año y los efectos adversos son muy poco frecuentes. Entre el 60% y el 90% de los recién nacidos infectados son totalmente asintomáticos. Los recién nacidos sintomáticos no tienen un cuadro clínico definido, pero los síntomas que aparecen con mayor frecuencia son prematuridad, bajo peso al nacer, hepatoesplenomegalia, hemorragias cutáneas, ictericia y síntomas de distrés respiratorio. Los casos más graves cursan con alteraciones cardíacas y meningoencefálicas. Los datos sobre mortalidad neonatal no son concluyentes, aunque se estima que entre el 4% y el 14% de los niños infectados mueren si no reciben tratamiento.

Si el individuo infectado por *T. cruzi* no ha sido tratado evoluciona a la fase crónica que se manifiesta en 4 formas clínicas: indeterminada, cardíaca, digestiva y neuronal. El 50%-70% de los infectados pueden permanecer asintomáticos durante décadas o de por vida, cursando lo que se conoce como forma indeterminada de la infección. Aproximadamente, el 30%-50% de la población infectada evoluciona a formas sintomáticas en un periodo de tiempo que oscila entre 20 y 30 años. La afectación orgánica más frecuente es la cardíaca que se presenta en dos tercios de los infectados, seguida de las alteraciones digestivas – megacolon y megaesófago– en el tercio restante y con menor frecuencia se observan alteraciones en el sistema nervioso periférico asociadas a estados de inmunodepresión por coinfección con el VIH, SIDA o tratamiento con inmunosupresores. El 98% de los infectados se diagnostican en esta etapa debido a la persistencia de anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* durante toda la vida en ausencia de tratamiento, sin embargo, la parasitemia es variable, intermitente e incluso indetectable.

El tratamiento tripanocida durante la fase crónica ha sido muy discutido y en general no estaba recomendado. No obstante, recientemente se ha demostrado que este tratamiento podría reducir la frecuencia de evolución hacia las formas graves. Los únicos fármacos activos frente a *T. cruzi* son el benznidazol (Radanil®), y el nifurtimox (Lampit®) de los que sólo el primero está fácilmente disponible en España a través del servicio de medicamentos extranjeros. En modelos animales se ha demostrado que el posaconazol tiene actividad anti-tripanosoma.

Teniendo en cuenta las características de la infección, la probabilidad de encontrar casos agudos en nuestro país es baja. No obstante, se pueden encontrar casos autóctonos cursando la fase aguda

de la enfermedad en individuos que hayan recibido una transfusión de hemoderivados sanguíneos o trasplante de órgano sólido, de donantes procedentes de áreas endémicas, y en recién nacidos de madres latinoamericanas seropositivas. Las mujeres embarazadas, así como el resto de la población procedente de países endémicos, se encuentran en la etapa crónica de la infección. El riesgo de infección tras un viaje a zona endémica es relativamente bajo, salvo si se ha realizado una estancia prolongada en zona rural o selvática o se ha recibido una transfusión sanguínea.

3. RECOGIDA Y TRANSPORTE DE MUESTRAS CLÍNICAS

Las directrices principales de recogida, conservación y transporte de las muestras para el diagnóstico de los parásitos intestinales se indican en los siguientes Procedimientos en Microbiología Clínica: nº 1 y 1a: Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras (SEIMC, 1993 y 2003), nº 7 Gastroenteritis bacterianas, víricas, parasitarias y toxi-infecciones alimentarias (SEIMC, 1994) y nº 30: Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales (SEIMC, 2008). En el presente documento se realizan consideraciones adicionales en referencia a las parasitosis importadas.

3.1. HECES

Recogida. Se deben recoger 3 muestras, preferentemente en días no consecutivos ya que la expulsión de parásitos no es constante. Se recomienda recogerlas en un periodo de 10 días ya que la excreción de protozoos intestinales es cíclica y al hacerlo así es más probable coincidir con los días de máxima excreción. La probabilidad de detectar parásitos en una sola muestra puede ser tan baja como 50%-60% pero es >95% si se analizan 3 muestras. En la estrongiloidiasis crónica la rentabilidad diagnóstica del examen de heces es menor.

Cantidad. En cada recipiente de transporte se debe incluir una cantidad de heces del tamaño de una nuez o unos 10 ml en el caso de heces líquidas. Cantidades muy escasas reducen la sensibilidad del examen. Con cantidades excesivas de heces los fijadores no alcanzan la proporción adecuada para conservar los posibles protozoos presentes y las heces fermentan y al aumentar la presión en el frasco pueden derramarse durante el transporte o apertura. En los quince días previos a la recogida de las heces no se deberían tomar antibióticos (especialmente tetraciclina o metronidazol) ni sales de bismuto. En los cuatro días previos se deben evitar los contrastes radiológicos, laxantes oleosos y antipalúdicos ya que interfieren en la detección de protozoos.

Conservación y transporte. Si el procesamiento se va a demorar es necesario utilizar productos fijadores que mantengan la morfología (especialmente de los protozoos) e impidan la evolución de huevos y larvas de helmintos sin necesidad de refrigeración de la

muestra. También disminuyen el riesgo de infección y el hedor en el laboratorio de microbiología. Las alternativas más habituales son:

- Formol en un tampón de acetato de sodio y ácido acético (SAF): puede ser utilizado para concentración, tinciones y con la mayoría de inmunoensayos. Es el más utilizado en nuestro medio.

- Agua con formol, al 10%.

- Mertiolato-yodo-formol (MIF).

En determinados casos las heces deben necesariamente remitirse sin conservantes.

Ejemplo de ello son:

- Detección de antígeno de *Entamoeba histolytica*. Si no se va a procesar en el momento es necesario refrigerar en nevera (2-8 °C)

- Cultivo de larvas de *Strongyloides* y uncinarias (métodos de Baermann, de Harada-Mori, cultivo en placa de agar etc.). Además, para mantener viables estos helmintos no deben refrigerarse, conservándose mejor entre 22°C y 35°C.

- Estudio de viabilidad de los huevos de *Schistosoma* spp. No refrigerar.

- PCR. Si se va a demorar su realización, deben congelarse.

3.2. TEST DE GRAHAM (PAPEL CELO PARA *Enterobius vermicularis*)

Consiste en una muestra de los márgenes del ano recogida con papel celo al levantarse por la mañana, y se debe recomendar al paciente que no se lave la zona perianal antes de realizar la toma. Se debe utilizar celo transparente (no translúcido tipo Scotch®) que se colocará sobre un portaobjetos. Es necesario recoger tres muestras en tres días consecutivos que deben ser transportadas al laboratorio en un sobre de papel cerrado o en un frasco, y nunca sueltos ya que los huevos de *E. vermicularis* ya son infectivos a las 4-6 horas de haber sido puestos.

3.3. GUSANOS Y OTROS PARÁSITOS MACROSCÓPICOS

La mayoría de los gusanos adultos o fragmentos eliminados espontáneamente son *Ascaris lumbricoides* que pueden ser expulsados por el ano, por la boca o por la nariz y *Enterobius vermicularis* y proglótides de cestodos que pueden verse en la superficie de las heces. Raramente se detectan otros como *Trichuris trichiura* y *Dipylidium caninum*. Las proglótides de *T. saginata*, migran activamente atravesando el ano, por lo que se las puede encontrar en los márgenes del mismo o en la ropa. Ocasionalmente se remiten larvas de mosca, *Anisakidae*, y otros elementos con aspecto de parásitos (incluyendo restos alimentarios y moldes mucosos intestinales). Cualquiera de ellos se debe enviar al laboratorio en un recipiente limpio, con agua o suero salino y conservar refrigerado.

3.4 CONTENIDO DUODENAL

La obtención de contenido duodenal puede ser útil en algunas parasitosis pero pocas veces se realiza sólo para este fin. Se puede recoger mediante sonda, endoscopia o cápsula entérica. Aumenta la sensibilidad en el diagnóstico de parásitos que habitan en el duodeno como *Giardia lamblia* y *Strongyloides stercoralis* o cuyos huevos se eliminan por vía biliar. La cápsula entérica (Enterotest®, Figura 1) es un sistema comercializado compuesto por una cápsula de gelatina que contiene un cordón de nailon, con un peso en el extremo y un indicador de pH para comprobar que ha pasado del estómago. Uno de los extremos del cordón se fija a la cara del paciente y la cápsula se deglute, llegando hasta el duodeno, la gelatina se disuelve y el cordón se libera y se impregna de bilis y moco duodenal. Se retira tirando del extremo oral y se analiza el material adherido.

Figura 1. Equipo de toma de muestra duodenal



Las muestras obtenidas por sonda o endoscopia se deben identificar y transportar rápidamente al laboratorio para su procesamiento inmediato. Si la muestra no va a ser procesada dentro de las 2 horas siguientes a su obtención, es necesario añadir SAF o formol al 10%. El cordón obtenido mediante el "Enterotest" se deposita en un recipiente con 2-5 ml de suero salino y se envía rápidamente al laboratorio.

3.5 SANGRE

Plasmodium spp. La sangre debe extraerse en cuanto se sospeche malaria, haya o no fiebre en ese momento. Puede ser necesario extraer muestras cada 6-12 horas durante 48 horas para descartar por completo la infección con microscopía, sobre todo en pacientes no inmunes, pacientes que han recibido fármacos antipalúdicos como profilaxis o tratamiento o cuando no se disponga de pruebas rápidas de detección antigénica (PRD).

Estudios recientes indican que los resultados de la microscopía y las PRD son similares con sangre capilar obtenida por punción digital o con sangre venosa anticoagulada recogida en tubos con EDTA, siempre que las extensiones se preparen en menos de 30 minutos desde la extracción para evitar el deterioro de la morfología parasitaria.

Trypanosoma spp. Para el método de Strout se necesita sangre recogida sin anticoagulante. Si la parasitemia es elevada se puede detectar el parásito

a partir de sangre anticoagulada, suero o plasma. Para observar los parásitos en movimiento, o conseguir su aislamiento en cultivo, es necesario enviar la muestra al laboratorio inmediatamente y analizarla en un plazo óptimo de menos de 4 horas después de su obtención, para ello se puede conservar refrigerada o a temperatura ambiente. En el diagnóstico parasitológico de la infección congénita, se recomienda la utilización de sangre periférica obtenida del talón. La utilidad de la sangre del cordón es discutida por la posible contaminación con sangre materna. En las infecciones crónicas la parasitemia puede ser indetectable o fluctuante, por lo que se aconseja procesar volúmenes de sangre de al menos 10 ml en adultos y 5 ml en niños.

Filarias. Se aconseja remitir una muestra de sangre anticoagulada de 10 ml para procesarlo por técnicas microscópicas. Si se sospechan filarias linfáticas también debe remitirse una muestra de sangre extraída de noche.

3.6. SUERO

Hay que desinfectar la piel y extraer sangre en un tubo seco, sin anticoagulante que se mantendrá refrigerado a 2°C-6°C o congelado si su procesamiento se va a demorar unas horas. Algunos ensayos serológicos y de PCR se pueden realizar a partir de muestras de sangre secas en papel absorbente que pueden remitirse por correo. Algunas pruebas serológicas pueden realizarse empleando sangre anticoagulada.

3.7. LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

Cuando se sospecha una enfermedad del sueño, un Chagas cerebral o una meningoencefalitis amebiana se deben priorizar las pruebas a realizar y es esencial contactar con el laboratorio para realizar de inmediato un examen en fresco del LCR.

3.8. MUESTRAS DE TEJIDO

Para las sospechas de leishmaniasis cutáneas y de chancros de inoculación de tripanosomiasis son adecuadas las siguientes muestras:

- Biopsia: con un sacabocados (*biopsy punch*), estéril de 3-4 mm de diámetro se toma un cilindro de tejido del reborde indurado de la lesión. Nunca se debe tomar del fondo de la úlcera que suele estar infectado secundariamente siendo difícil la visualización de los parásitos. Se deposita en un tubo con unas gotas de suero salino fisiológico o de tampón NET 10 (NaCl 10 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM).

- Exudado del borde de la úlcera: se realiza una incisión con un bisturí y se raspan los márgenes de dicho corte. El material obtenido se introduce en un tubo de las características anteriores para cultivo y otra parte del material se extenderá en un portaobjetos para examen microscópico.

- Aspirado de la lesión: con una jeringuilla de 1 ml, se puede inocular un pequeño volumen de solución salina en el borde de la úlcera y aspirarlo comprimiendo la lesión. Parte del material se deposita en un tubo estéril y se realiza un frotis con

el resto. Las muestras se mantendrán a temperatura ambiente hasta su procesamiento. Este sistema se emplea también para aspirar adenopatías en caso de sospecha de tripanosomiasis africana.

En el caso de sospecha de leishmaniasis visceral, en nuestro entorno, las muestras de elección son el aspirado o biopsia de médula ósea y la sangre anticoagulada. Se mantendrán a temperatura ambiente hasta su transporte al laboratorio. La sangre preferentemente se debe procesar inmediatamente para la separación de las células mononucleares de sangre periférica y en su defecto se puede conservar hasta 24 horas a 4°C. La punción esplénica no se recomienda por el riesgo de ruptura.

Las muestras de piel para detección de *Oncocerca* spp. se deben remitir en un tubo con unas gotas de suero salino a temperatura ambiente o bien realizar la toma en el laboratorio.

3.9. ORINA

Para detectar *Schistosoma haematobium* en orina se debe enviar al laboratorio un volumen de más de 100 ml de orina incluso toda la orina de 24 horas. La rentabilidad aumenta si la muestra se recoge entre las 10 y las 15 horas del día y si se realiza ejercicio antes de recogerlo. Se envía al laboratorio en un recipiente limpio y se refrigera o se añade aproximadamente un 1% de formol.

3.10. MUESTRAS PARA PRUEBAS DE PCR

Para la detección de ácidos nucleicos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es conveniente que la muestra no sufra muchos cambios de temperatura y es preferible que se conserve a 4°C. Para tiempos de conservación prolongados conviene congelarlo a -20°C. Dependiendo de la prueba a realizar, la adición a la muestra de proteinasa K o guanidina-EDTA puede mejorar la sensibilidad del ensayo.

4. DIAGNOSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS PARASITOSIS IMPORTADAS

4.1. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LOS PARÁSITOS INTESTINALES IMPORTADOS

4.1.1 Parasitosis intestinales importadas.

Consideraciones diagnósticas generales. Las parasitosis intestinales tienen una gran morbilidad debida a su altísima prevalencia en países tropicales y subtropicales. Actualmente, debido a la inmigración, los viajes internacionales, los cambios en la alimentación (ej. ingesta de carne o pescado crudo) y a la importación de alimentos, estamos asistiendo a un aumento de la incidencia de parasitosis intestinales, lo que nos obliga a adecuar nuestros conocimientos y nuestras técnicas diagnósticas a este fenómeno tanto a nivel hospitalario como en Atención Primaria.

Los parásitos intestinales pueden clasificarse en tres grupos en función a su prevalencia en nuestro medio:

- Parásitos considerados estrictamente importados por tener una localización geográfica determinada, ej. *Clonorchis sinensis*.
- Parásitos de distribución mundial con baja prevalencia en nuestro país y más frecuentes en otros países, ej. *Strongyloides stercoralis*, *Ascaris lumbricoides*.
- Parásitos considerados autóctonos pero que también son muy frecuentes en otros países y que se deben incluir en el estudio de inmigrantes y viajeros, ej. *Giardia lamblia*.

Es importante conocer:

- Las zonas de exposición: no sólo el país y comarca de origen del paciente, sino también la ruta migratoria.
- El tiempo que transcurre desde que el paciente adquiere el parásito hasta que se pueden observar las formas diagnósticas: quistes, huevos o larvas en las heces (período prepatente). Tiene especial importancia para evitar dar por descartadas parasitosis en viajeros recientemente parasitados.

- El mecanismo de transmisión de estos parásitos y su potencial para producir casos secundarios. Este potencial es alto para organismos transmisibles por contacto directo (*Enterobius vermicularis*) o indirecto, incluyendo agua o alimentos contaminados, el agua de piscinas o las relaciones orogenitales (*Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* spp., *Giardia lamblia*). En países con adecuadas instalaciones de conducción y tratamiento de aguas residuales son poco probables los casos secundarios debidos a parásitos intestinales que requieren un tiempo de maduración para ser infectivos como *Cyclospora cayetanensis*, *Ascaris lumbricoides* o *Trichuris trichiura*.

En las tablas 1 a 7 se indican algunas características de estos parásitos, resaltando su periodo prepatente y una aproximación clínica y epidemiológica.

Tabla 1. Protozoos patógenos.

Organismo	Periodo prepatente	Formas en heces	Manifestaciones clínicas	Distribución geográfica
<i>Entamoeba histolytica</i> *	2-21 días	Quiste, trofozoíto	Diarrea-disentería Ameboma Abscesos	Mundial, más frecuente en áreas tropicales y subtropicales
<i>Giardia lamblia</i>	6-21 días	Quiste, trofozoíto	Diarrea, malabsorción, dolor abdominal	Mundial, muy frecuente
<i>Dientamoeba fragilis</i>	Desconocido	Trofozoíto	Diarrea, dolor abdominal	Mundial, poco frecuente
<i>Cryptosporidium</i> spp.**	4-22 días	Ooquiste maduro	Diarrea	Mundial, muy frecuente
<i>Isospora belli</i>	9-17 días	Ooquiste inmaduro	Diarrea Malabsorción Eosinofilia	Mundial, más frecuente en áreas tropicales y subtropicales
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	1-3 semanas	Ooquiste inmaduro	Diarrea Pérdida de peso	Mundial. Endémica en América Central y del Sur, Asia (Nepal)
<i>Sarcocystis bovi hominis</i>	14-18 días	Ooquiste maduro, esporoquiste	Diarrea	Mundial, infrecuente
<i>Sarcocystis sui hominis</i>	11-13 días	Ooquiste maduro, Esporoquiste	Diarrea	Mundial, infrecuente
<i>Balantidium coli</i>	4 días-semanas	Quiste, trofozoito	Colitis, disentería	Mundial, infrecuente
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	Desconocido	Espora	Diarrea	Mundial, mas frecuente en inmunodeprimidos
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	Desconocido	Espora	Diarrea	Mundial, poco frecuente África, Australia
<i>Blastocystis hominis</i>	2 días-semanas	Quiste	Diarrea (¿?) Patogenicidad discutida	Mundial, muy frecuente

*Indistinguible morfológicamente de *Entamoeba dispar* y de *Entamoeba moshkovskii*.
Entamoeba coli, *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba polecki* (muy frecuente en Papúa-Nueva Guinea),
Endolimax nana, *Iodamoeba bütschlii*, *Chilomastix mesnili*, *Pentatrichomonas hominis*, *Enteromonas hominis*,
Retortamonas intestinalis, no son considerados patógenos.
***C. hominis*, *C. Parvum*. Menos frecuentes: *C. meleagridis*, *C. canis*. Muy raros: *C. felis*, *C. muris*, *C. suis*, *C. cervine*

Tabla 2. Nematodos intestinales.

Organismo	Periodo prepatente (semanas)	Vida media	Formas en heces	Modo de infección	Distribución geográfica
<i>Ascaris lumbricoides</i>	8	1-2 años	Huevos Gusano adulto	Ingestión de huevos infectivos (tras 2-3 semanas en el suelo)	Mundial, más frecuente en países tropicales y subtropicales
<i>Enterobius vermicularis</i>	3 - 4	1-2 meses	Raro en heces En márgenes anales huevos, y gusano adulto (Test de Graham)	Ingestión de huevos infectivos (4-6 horas)	Mundial
<i>Strongyloides stercoralis</i>	2 - 4	>40 años	Larva rabditiforme habitualmente. Larva filariforme	Larvas filariformes por vía cutánea Autoinfección	-Mundial, más frecuente en países tropicales y subtropicales
<i>Strongyloides fuelleborni</i>			Huevos		-África Central-Este Papúa-Nueva Guinea
<i>Trichostrongylus</i> spp.	2 - 3	1 año	Huevos; larva rabditiforme si se demora el estudio	Ingestión de larvas (en 3-5 días en el suelo)	Japón, Corea, China, Taiwán, Irán, Rusia
<i>Trichuris trichiura</i>	12	5-15 años	Huevos Raro: gusano adulto	Ingestión de huevos infectivos (tras 2-3 semanas en el suelo)	Mundial, más frecuente en países tropicales y subtropicales
Uncinarias: <i>Ancylostoma duodenale</i> <i>Necator americanus</i>	4 - 8	5-7 años	Huevos; larva rabditiforme si se demora el estudio	(Tras 5-7 días) -Larvas filariformes por vía cutánea o por ingestión	Sudeste asiático, India, Pacífico Sur, cuenca del Mediterráneo, zona andina América. -América Central y del Sur, Asia sudoriental, África tropical
		4-20 años		-Larvas filariformes por vía cutánea	
<i>Capillaria philippinensis</i>	4		Huevos Raro: larvas, gusano adulto	Ingestión pescado crudo	Sudeste asiático, India, Irán, Japón, Egipto

Tabla 3. Cestodos intestinales.

Organismo	Periodo prepatente (semanas)	Vida media	Formas en heces	Infección por ingestión de cisticercos en:	Distribución geográfica
<i>Taenia saginata</i>	10 – 12	Hasta 25 años	Huevos Proglótides	Carne de vaca	Mundial
<i>Taenia saginata asiatica</i>	10 – 12	Hasta 25 años	Huevos Proglótides	Carne e hígado de cerdo	Sudeste asiático
<i>Taenia solium</i>	5 - 12	Hasta 25 años	Huevos Proglótides	Carne de cerdo (Huevos: cisticercosis)	Mundial, endémica en América Latina, Asia, África
<i>Hymenolepis nana</i>	2 – 3	Adulto vive 1 año, pero la infección persiste por la autoinfección	Huevos	Ingestión de cisticercos (artrópodos) o de huevos (autoinfección)	Mundial, es la tenia más común en EEUU. América Latina
<i>Hymenolepis diminuta</i>	3	< 1 año	Huevos	Coleópteros de la harina: <i>Tenebrio</i> spp., <i>Tribolium</i> spp. ..	Mundial, más común en India, Rusia, Japón
<i>Diphyllobothrium latum</i> <i>Diphyllobothrium pacificum</i>	3-5	Hasta 25 años	Huevos Proglótides	Ingestión de plerocercoides (peces)	-Mundial, más frecuente Norte de Europa, Norte y Sur América, Japón -Perú, Chile
<i>Dipylidium caninum</i>	3-4	< 1 año	Huevos Proglótides	Pulgas y malófagos de perros:	Mundial

Tabla 4. Trematodos intestinales.

Organismo	Periodo prepatente (semanas)	Formas en heces	Infección por ingestión de metacercarias en:	Distribución geográfica
<i>Fasciolopsis buski</i>	12	Huevos	Plantas acuáticas	Lejano Oriente
<i>Heterophyes heterophyes</i>	1 - 2	Huevos	Peces agua dulce	Lejano Oriente Oriente Medio
<i>Metagonimus yokogawai</i>	2 - 3	Huevos	Peces agua dulce	Lejano Oriente, Egipto, Israel, Rusia
<i>Echinostoma</i> spp. (<i>ilocanum</i> ...)	Desconocido	Huevos	Moluscos agua dulce	Oriente Medio, Lejano Oriente
<i>Gastrodiscoides hominis</i>	Desconocido	Huevos	Plantas acuáticas, moluscos y peces agua dulce	Lejano Oriente, Rusia, Nigeria, Zambia

Tabla 5. Trematodos tisulares cuyos huevos se eliminan por heces.

Organismo	Periodo prepatente (semanas)	Infección por ingestión de metacercarias en:	Localización	Distribución geográfica
<i>Fasciola hepatica</i>	8-12	Plantas acuáticas: berros	Vía biliar	Cosmopolita
<i>Fasciola gigantica</i>	8-12	Plantas acuáticas	Vía biliar	África, Oriente, Europa del Este
<i>Clonorchis sinensis</i>	12	Peces agua dulce	Vía biliar	Lejano Oriente
<i>Opisthorchis viverrini</i>	3-4	Peces agua dulce	Vía biliar	Norte Tailandia Laos
<i>Opisthorchis felinus</i>	3-4	Peces agua dulce	Vía biliar	Europa del Este
<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	Desconocido	Hormigas, grillos	Vía biliar	Cosmopolita
<i>Paragonimus westermani</i>	5-6	Cangrejos agua dulce	Pulmón	Extremo oriente, Pacífico, India
<i>Paragonimus mexicanus</i>	5-6	Cangrejos agua dulce	Pulmón	América Central y del Sur
<i>Paragonimus africanus</i>	5-6	Cangrejos agua dulce	Pulmón	África

Tabla 6. Trematodos hemáticos cuyos huevos se eliminan por heces.

Organismo	Periodo prepatente (semanas)	Localización	Distribución geográfica
<i>Schistosoma mansoni</i>	4-7	Plexo mesentérico	África, América de Sur, Caribe, Yemen, Arabia Saudita
<i>Schistosoma japonicum</i>	5-6	Plexo mesentérico	China, Japón, Indonesia, Filipinas
<i>Schistosoma mekongi</i>	4-6	Plexo mesentérico	Sudeste Asiático
<i>Schistosoma intercalatum</i>	4-6	Plexo mesentérico	África Central y Occidental
<i>Schistosoma haematobium</i> *	12	Plexo vesical	África, Oriente Medio, India
<p>Infección por penetración de las cercarias a través de la piel en contacto con agua contaminada. Pueden vivir 30-40 años *Huevos de <i>S. haematobium</i> normalmente se observan en orina pero ocasionalmente pueden hallarse en heces</p>			

Tabla 7.- Resumen de periodos mínimos aconsejables desde la parasitación hasta poder considerar negativo el examen parasitológico de heces.

Periodo prepatente máximo descrito	Parásitos intestinales
Hasta 3 semanas	<i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giardia lamblia</i> <i>Cryptosporidium</i> spp. <i>Isospora belli</i> <i>Cyclospora cayetanensis</i> <i>Sarcocystis</i> spp. <i>Trichostrongylus</i> spp. <i>Heterophyes heterophyes</i> <i>Hymenolepis</i> spp. <i>Metagonimus yokogawai</i>
Hasta 4 semanas	<i>Enterobius vermicularis</i> <i>Strongyloides</i> spp. <i>Capillaria philippinensis</i> <i>Dipylidium caninum</i> <i>Opisthorchis</i> spp.
Hasta 6 semanas	<i>Diphyllobothrium</i> spp. <i>Paragonimus</i> spp. <i>Schistosoma japonicum</i> <i>Schistosoma mekongi</i> <i>Schistosoma intercalatum</i>
Hasta 2 meses	<i>Ascaris lumbricoides</i> <i>Ancylostoma duodenale</i> <i>Necator americanus</i> <i>Schistosoma mansoni</i>
Hasta 3 meses	<i>Trichuris trichiura</i> <i>Taenia</i> spp. <i>Fasciola</i> spp. <i>Fasciolopsis buski</i> <i>Clonorchis sinensis</i>

En el Procedimiento en Microbiología Clínica nº 7: Gastroenteritis bacterianas, víricas, parasitarias y toxi-infecciones alimentarias (SEIMC, 1994) y en el nº 30: Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales (SEIMC, 2008) se indican las directrices principales de procesamiento de las muestras de heces para diagnóstico de parásitos intestinales.

Se debe realizar examen macroscópico y examen microscópico en fresco de heces sin conservantes y tras concentración. Se pueden realizar tinciones permanentes: Kinyoun, Ziehl-Neelsen modificado o auramina para coccidios; tricrómico para protozoos en general; Ryan-Webber o calcoflúor para microsporidios; inmunofluorescencia para *Giardia* spp. o *Cryptosporidium* spp.; pruebas de detección antigénica y PCR.

El examen microscópico en fresco con solución salina a 37°C está indicado para el diagnóstico rápido de disenterías parasitarias (amebiasis, balantidiosis, estrongiloidiasis, trichiuriasis o

esquistosomiasis). Se deben extremar las precauciones para evitar posibles infecciones en el personal técnico ya que la muestra puede contener microorganismos patógenos viables, algunos con una dosis infectiva muy baja como *Shigella* spp.

Respecto a las técnicas de concentración, el método recomendado si sólo se utiliza uno, es el de sedimentación con formol o SAF y acetato de etilo, centrifugando 10 minutos a 500 xg.

El método de flotación está en desuso. Es más laborioso de preparar y tiene el inconveniente de que larvas y quistes pueden colapsarse dificultando su reconocimiento y que los huevos infértiles de *Ascaris lumbricoides* y los huevos operculados (trematodos y *Diphyllobothrium*) no siempre flotan, por lo que hay que examinar tanto el sobrenadante como el sedimento.

El diagnóstico se basa en las características morfológicas de los parásitos observados según se indica en el siguiente esquema:

Protozoos	Helminths
Forma, tamaño, refringencia Estadio: trofozoíto, quiste, ooquiste Citoplasma: barras cromidiales, vacuolas de glucógeno, axonema, axostilo Núcleos: número, cromatina, cariosoma	Huevos, larvas o adultos; tamaño, estructuras internas Huevo: forma, pared, opérculos, ganchos, filamentos polares, espinas Larvas: morfología de cabeza y cola, tracto digestivo, primordio

Se pueden encontrar tablas y figuras para ayuda en el diagnóstico morfológico accesibles en: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/MorphologyTables.htm>

4.1.2. Diagnóstico microbiológico de la amebiasis. La fiabilidad diagnóstica del examen microscópico de heces en amebiasis es muy dependiente de la experiencia del microscopista y, en general, no es alta ni siquiera en laboratorios de

referencia (Tabla 8). *Entamoeba histolytica* es morfológicamente idéntica a *E. dispar* y *E. moshkovskii*. Para su diferenciación se pueden utilizar técnicas de detección de antígeno, de PCR o cultivo con estudio de isoenzimas. Se requieren muestras de heces sin conservante ya que éste desnaturaliza los antígenos y el ADN. Existen distintos ensayos inmunoenzimáticos que tienen mayor sensibilidad que el examen microscópico aunque menor que la PCR, pero tienen la ventaja de estar comercializados: *Entamoeba* CELISA PATH (Cellabs, Vitro) que utiliza un anticuerpo monoclonal específico para la lectina de *E. histolytica*; *Entamoeba histolytica* II Test (TechLab, Inverness) con anticuerpos monoclonales frente a la lectina Gal/GalNac de *E. histolytica*; Optimum S kit (Merlin Diagnostika) que utiliza anticuerpos monoclonales frente al antígeno rico en serina de *E. histolytica*. La detección de anticuerpos en suero es una prueba diagnóstica fundamental que se debe solicitar en pacientes con abscesos sin etiología bacteriana demostrada aún en ausencia de exposición a zonas endémicas. Su utilidad en las formas intestinales está siendo reevaluada.

Tabla 8. Sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas para amebiasis

Método	Muestra	Sensibilidad (%)		Especificidad (%)
		Disentería	Absceso hepático	
Examen microscópico	Heces	25-60	<10	10-50
	Aspirado absceso	-----	<25	-----
Detección de antígeno (EIA)	Heces	>95	Normalmente negativo	>95
	Suero	65 (temprano)	100 (antes tratamiento), 75 (tardío)	>90
	Aspirado absceso	-----	100(antes tratamiento)	90-100
Detección de anticuerpos	Suero (Infección aguda)	75-85	70-100	>85
	Suero (Convalecencia)	>90	>90	
Cultivo y análisis de isoenzimas	Heces	Más bajo que antígeno y PCR	<25	Prueba de referencia
PCR	Heces	>90	-----	>90
	Aspirado absceso	-----	100	90-100

Se debe considerar la posibilidad de absceso amebiano en los abscesos en los que no se observen microorganismos en la tinción de Gram y el cultivo bacteriano sea estéril, incluso en ausencia de datos epidemiológicos de exposición. En los abscesos amebianos el examen microscópico tiene una baja sensibilidad por lo que se recomienda analizar el material del absceso por PCR para *E. histolytica* y realizar estudio serológico.

Los anticuerpos anti-*E. histolytica* se detectan a partir de la primera semana en más del 90% de pacientes con infección invasiva (extraintestinal). Pueden permanecer elevados durante meses o incluso hasta 10 años después de la curación, lo que complica el diagnóstico en pacientes provenientes de países endémicos, al no poder distinguir entre

infección actual o infección pasada en muchos casos.

En recién nacidos, los anticuerpos maternos desaparecen a los 3 meses, por lo que si persisten puede indicar enfermedad activa.

Los pacientes con infección por *Entamoeba dispar* y *Entamoeba moshkovskii* no producen anticuerpos detectables.

Se han desarrollado y comercializado diferentes métodos de detección de anticuerpos (hemaglutinación indirecta, aglutinación con látex, fijación de complemento, inmunofluorescencia indirecta, inmunoenzimático) con diferente sensibilidad y especificidad (ver la Tabla 9).

Tabla 9. Sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas comerciales para amebiasis.

Ensayo	Sensibilidad %	Especificidad %	Fabricante
Cellognost-Amoebiasis (HAI)	100*; 99	90,9-100*; 99,8	Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Germany
Amoebiasis (HAI)	93,4	97,5	Fumouze Diagnostics, Levallois-Perret Cedex, France
Novagnost Entamoeba IgG	>95**	>95**	NovaTec Immundiagnostica GmbH, Dietzenbach, Germany
Bichro-Latex Amibe	93,3; 98,3	95,5; 96,1	Fumouze Diagnostics, Levallois-Perret Cedex, France
Amoeba-Spot IF	ND	ND	bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France
Amebiasis Serology microplate ELISA	95**	97**	Light Diagnostics
Amebiasis Serology microwell EIA (HK-9 antigen, axenic)	97,9; 92,5	94,8; 91,3	LMD Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA
Amebiasis Serology Microwell EIA	92,5	91,3	IVD Research, Carlsbad, Calif.
DRG <i>Entamoeba histolytica</i> IgG	92**	100**	DRG International Inc., USA
RIDASCREEN <i>Entamoeba</i> (IgG detection)	100**; 97,7-100	95,6**; 97,4	R-Biopharma AG, Darmstadt, Germany
*Para títulos $\geq 1:64$, 100% sensibilidad y 90,9% especificidad; para títulos $\geq 1:512$, 100% sensibilidad y 100% especificidad			
** Datos del fabricante			

4.1.3. Diagnóstico microbiológico de la ciclosporidiosis. En casos de diarrea importada de zonas tropicales se debe descartar la presencia de *Cyclospora cayetanensis*. En viajeros se suele manifestar como un cuadro agudo de diarrea acuosa profusa y síntomas abdominales inespecíficos, frecuentemente con importante pérdida de peso. Sin tratamiento acaba remitiendo en unos meses a veces con clínica intermitente. Es especialmente frecuente en pacientes procedentes de Nepal, Perú, Haití o Indonesia. Su diagnóstico se puede sospechar al observar en el examen en fresco esferas refringentes de 7-10 micras de diámetro. Para confirmarlo se observan los ooquistes inmaduros mediante:

- Tinción de Kinyoun, de Ziehl-Neelsen o auramina modificadas ya que es parcialmente ácido-alcohol resistente.
- Examen con microscopio de luz ultravioleta. Con este método sin añadir colorante los ooquistes se pueden observar como círculos autofluorescentes de color azul con filtro de 365 nm o verde con filtro de 450 a 490 nm.

4.1.4. Diagnóstico microbiológico de las helmintiasis. Como complemento de lo indicado en el Procedimiento 30 (SEIMC, 2009) se añaden unas recomendaciones útiles para los microbiólogos interesados en este tema.

- Para la detección de huevos y larvas de helmintos la preparación se debe observar con el objetivo de 10x dado su gran tamaño, excepto los huevos de *Clonorchis* spp., *Opisthorchis* spp., *Heterophyes* spp. y *Metagonimus* spp. que son

de menor tamaño y pueden precisar el de 40x para su identificación.

- *Ascaris* spp. y *Trichuris* spp. frecuentemente coexisten en el mismo paciente ya que los requerimientos para el desarrollo de los huevos infectivos en el suelo son los mismos.
- Los huevos de *Fasciola* spp., *Fasciolopsis* spp. y *Echinostoma* spp. son muy semejantes en forma y tamaño, por lo que la diferenciación debe ayudarse de los datos clínicos y epidemiológicos del paciente.
- Los huevos de *Fasciola* spp., *Dicrocoelium* spp. y *Capillaria hepatica* pueden ser observados en las heces de pacientes que hayan comido hígado infestado. Para diferenciarlo de una verdadera parasitación se debe repetir el estudio después de una dieta libre de hígado al menos durante tres días. La inmensa mayoría de los hallazgos de huevos de *Dicrocoelium* spp. se trata de un pseudo parasitismo.
- Los huevos de *Paragonimus* spp. son muy semejantes a los de *Dipyllobothrium* spp..
- Los huevos de *Schistosoma haematobium* normalmente se encuentran en orina pero a veces también se pueden encontrar en heces siendo difíciles de distinguir morfológicamente de los de *Schistosoma intercalatum*. Se pueden diferenciar ya que los de *S. intercalatum* son ácido-alcohol resistentes.
- El método de Kato-Katz es útil sólo para la investigación de huevos de helmintos, especialmente para *Fasciola* spp. y *Schistosoma* spp..

- Las larvas que habitualmente se encuentran en heces son las de *Strongyloides stercoralis*, pero si las heces han permanecido a una temperatura cálida durante más de 24 horas antes de ser estudiadas, los huevos de uncinaria y de *Trichostrongylus* spp. pueden eclosionar y será necesario diferenciar sus larvas de las de *Strongyloides* spp..
- Los huevos de *Taenia saginata* y *T. solium* son idénticos morfológicamente. Para la identificación de la especie se requiere estudiar las proglótides o realizar PCR.
- Las proglótides de *Dipylidium caninum* son pequeñas, semejantes a pepitas de melón, con dos poros genitales.

4.1.4.1. Pruebas serológicas para helmintiasis intestinales. Son métodos actualmente en desarrollo con buenas perspectivas en un futuro inmediato. Sin embargo de momento son pocos los métodos desarrollados para el diagnóstico serológico de las parasitosis intestinales, algunos de ellos están comercializados, otros sólo se realizan en centros de referencia. Tienen el inconveniente de no distinguir entre una infección actual y una infección pasada por lo que son más útiles en zonas donde la infección no es endémica o en viajeros. Además, con frecuencia tienen problemas de reacciones cruzadas especialmente en el diagnóstico de helmintos, tanto intestinales como hemáticos y tisulares. Por otro lado para el cálculo de los valores de sensibilidad y especificidad suele faltar un patrón oro de certeza diagnóstica.

Las serologías de helmintos más comunes o más útiles son las de hidatidosis, cisticercosis, fascioliasis, esquistosomiasis, toxocariasis, anisakirosis, filariasis y estrongiloidiasis.

4.1.4.2. Helmintos adultos. Los nematodos pueden conservarse introduciéndolos en agua caliente (60°C-63°C) y después fijados en alcohol al 70% con 5% de glicerina.

En España la mayor parte de las tenias que se diagnostican son *T. saginata*. En Portugal y Extremadura continúan detectándose casos autóctonos de *T. solium* y de cisticercosis. Las proglótides se colocan 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 extrema precaución, siempre con guantes sobre papel de filtro desechable, ya que los huevos de *Taenia solium* son infectantes (causan cisticercosis). Las proglótides maduras de *Dipylidium caninum* miden menos de 7 mm de longitud, tienen dos poros genitales y en el interior no se observa un útero ramificado sino acúmulos de huevos. Si las proglótides están muy deterioradas se puede realizar el diagnóstico por PCR en centros de referencia.

4.1.4.3. Contenido duodenal. Se puede obtener mediante sondaje, endoscopia o cordón duodenal (Enterotest[®]) y debe ser procesado inmediatamente.

La cantidad obtenida por sondaje o endoscopia puede variar desde <0,5 ml a varios ml. Se debe realizar examen microscópico en fresco y tras centrifugación (10 minutos a 500 xg) buscando fundamentalmente trofozoítos de *Giardia lamblia* y larvas de *Strongyloides* spp. Pueden observarse también huevos de trematodos hepáticos. Realizar tinción de Kinyoun para *Cryptosporidium* spp.

Si la muestra se obtiene por "Enterotest" se procederá de la siguiente forma: ponerse guantes. Agitar el recipiente que contiene el cordón de nailon y el suero salino, utilizando el vórtex. Retirar el cordón del recipiente exprimiéndolo con los dedos, centrifugar el líquido durante 10 minutos a 500 xg. y observar al microscopio. Realizar tinción de Kinyoun para *Cryptosporidium* spp.

En ambos casos se puede realizar inmunofluorescencia directa o detección de antígeno para *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp.

4.1.4.4. Test de Graham. También conocido como test del papel celo, se usa para demostrar la parasitación por *Enterobius vermicularis* (oxiuros). Los huevos se visualizan mejor añadiendo aceite de inmersión que además aclarará el celo si éste fuera opaco.

4.1.5. Diagnóstico microbiológico de la estrongiloidiasis. Esta parasitación se debe sospechar en los pacientes con disentería aguda, con lesiones cutáneas sugestivas de larva currens o con hipereosinofilia procedentes de zonas endémicas especialmente si se han expuesto a barro. En Europa occidental quedan focos activos en Valencia (comarca de la Safor), en el Piamonte y en los Pirineos occidentales franceses (valle alto del río Garona). También se debe descartar o tratar empíricamente en pacientes con posibles antecedentes de exposición, aunque sea remota en el tiempo (pueden persistir durante décadas), si van a ser sometidos a tratamientos inmunosupresores.

4.1.5.1. Pruebas de migración-cultivo de larvas de Strongyloides spp.

El diagnóstico de *Strongyloides stercoralis* se basa en la detección de sus larvas en heces, pero salvo en infección aguda o casos de hiperinfestación se suelen eliminar en escasa cantidad y esporádicamente, por lo que la sensibilidad de los métodos habituales de concentración es muy baja. Se han desarrollado métodos específicos de enriquecimiento por migración-cultivo de larvas. Estos métodos son útiles también para detectar bajas parasitaciones por uncinarias y *Trichostrongylus* spp.

Se debe realizar especialmente en pacientes con eosinofilia o que van a recibir esteroides o tratamiento inmunosupresor y proceden de zonas endémicas.

Figura 2.



Migración de *Strongyloides* en agar sangre

Existen diversos métodos, siendo imprescindible que las heces sean frescas y sin refrigerar ya que estos helmintos pierden viabilidad a bajas temperaturas. En todos los casos hay que manejar las muestras y cultivos con precaución, siempre con guantes, debido a la posible presencia de larvas filariformes, infectivas a través de la piel. Si se dispone de una campana de extracción de gases su empleo reduce el molesto hedor que se produce en estos procedimientos. La rentabilidad diagnóstica es directamente proporcional a la cantidad de muestra que se procese y aumenta si se repite el ensayo en varias ocasiones (tres se considera un número razonable).

- **Cultivo en placa de agar:** es la técnica más sensible y la que se recomienda. Consiste en poner una cantidad de heces recientes en una placa de agar, incubarla a 28°C-30° C y examinarla buscando el rastro de bacterias inoculado por las larvas en su migración (ver Figura 2). La presencia de rastro es indicativa de parasitación por *Strongyloides* spp., *Necator* spp., *Ancylostoma* spp. o *Trichostrongylus* spp. Si se ven rastros se puede inundar la placa con agua formolada al 10%, pasar un asa de cultivo por toda la superficie (excepto donde permanece la porción de heces) para llevarse los helmintos presentes, pasar el líquido a un tubo, centrifugarlo e identificar morfológicamente el o los helmintos en cuestión.

- **Harada-Mori:** en un tubo cónico se introduce una tira de papel de filtro, cortada en punta en un extremo y en cuya zona central se ha depositado una cantidad de al menos 1 gr. de heces. Se añade agua a la base del tubo, de manera que el papel siempre esté húmedo. Se incuba a 30°C durante 15 días, manteniendo el nivel de agua. Las larvas migran a través del papel de filtro hacia el agua. Hay que tener cuidado al manipular la muestra porque también pueden migrar hacia el tapón. Periódicamente se deben coger unas gotas del fondo del tubo para buscar larvas. Utilizar el objetivo de 10x para el examen. Al final del período de incubación se añade 1 ml de formol al tubo, se extrae toda el agua

del fondo, se centrifuga y se observa el sedimento al microscopio (Figura 3).

Figura 3.



- **Concentración de Baermann:** el aparato de Baermann consiste en un embudo colocado sobre un soporte universal de laboratorio que en su extremo estrecho tiene un tubo de goma sujeto por una pinza. Se llena el embudo con agua y se coloca una malla metálica fina y varias capas de gasa, que toquen la superficie del agua. Sobre la gasa se colocan unos 10 gr. de heces recién defecadas. De forma inmediata las larvas de *Strongyloides* spp. comienzan a migrar de las heces al agua. A las 2-3 horas se abre la pinza que cerraba el tubo de goma y se recogen 5-10 ml de agua que se centrifuga. Se observa el sedimento buscando larvas.

- **Cultivo con carbón.** Se mezclan las heces con carbón activado hasta formar una pasta homogénea. En una placa de Petri colocar un disco de papel humedecido de menor diámetro que la placa. En el centro colocar las heces y guardar en la oscuridad. Mantener siempre húmedo el papel. Al cabo de 5-6 días observar el borde del papel con lupa o al microscopio en busca de larvas.

4.1.5.2 Serología de *Strongyloides stercoralis*

La demostración de anticuerpos anti-*Strongyloides* se utiliza como prueba de cribado o como complemento al diagnóstico. Utilizada junto con el nivel de eosinofilia puede ser útil para monitorizar el tratamiento, ya que el nivel de anticuerpos disminuye después de 6 meses del tratamiento eficaz y puede negativizarse en 12-24 meses. Existen varios enzimo-inmunoanálisis comercializados, tienen un alto valor predictivo negativo y su sensibilidad es buena (Tabla 10) aunque disminuye en pacientes con neoplasias hematológicas y en infecciones por el virus HTLV-1. Se suelen producir reacciones cruzadas en parasitaciones por filarias, *Anisakis* spp., *Toxocara* spp. y otros nematodos.

Tabla 10. Sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas comerciales para estrongiloidiasis

Ensayo	Sensibilidad %	Especificidad %	Fabricante
<i>Strongyloides</i> Serology Microwell ELISA	89	97,2	IVD Research, Inc., Carlsbad
Bordier ELISA	83	97,2	Bordier Affinity Products SA
DRG <i>Strongyloides</i> IgG	100*	100*-	DRG International Inc., USA
* Datos del fabricante.			

4.2. DIAGNÓSTICO DE LA MALARIA

La malaria es la infección parasitaria importada por viajeros e inmigrantes más relevante porque puede ser rápidamente mortal y requiere un diagnóstico seguro y rápido para instaurar el tratamiento de forma precoz y prevenir las complicaciones.

El diagnóstico actual de la malaria se basa en el uso combinado y secuencial de las pruebas rápidas de detección de antígenos proteicos del parásito (resultado en < 20 minutos) y la visualización posterior del parásito teñido con solución de Giemsa en una gota gruesa (resultado en 2 horas) por un microscopista experto en muestras de sangre total capilar o venosa.

Si no se dispone de un microscopista experto, debe realizarse siempre una prueba de diagnóstico rápido muy sensible para descartar la infección por *Plasmodium falciparum*, emitir inmediatamente el resultado y preparar gotas gruesas (secadas al aire) y extensiones finas (fijadas con metanol) para su posterior tinción y revisión por un microscopista experto del propio laboratorio o de un laboratorio de referencia.

Información de resultados. La malaria es una enfermedad potencialmente mortal en cuestión de horas, sobre todo en pacientes no inmunes, y el laboratorio debe emitir resultados lo antes posible, preferentemente en menos de 1 hora. Se informará como mínimo si el paciente tiene o no malaria por *P. falciparum* y, cuando esté disponible el resultado de la microscopía, se añadirá al informe la identificación de especie y el grado de parasitemia. Debe informarse como mínimo el porcentaje de hematíes parasitados (parasitemia baja: <1 %, moderada: 1-5%, alta: > 5%) y, si fuera posible, se recomienda añadir también el recuento absoluto (trofozoítos/microlitro).

La relación entre la parasitemia y la gravedad de la infección varía según las poblaciones y los grupos de edad aunque, en general, las parasitemias muy altas se asocian a mayor riesgo de enfermedad más grave. Según las recomendaciones de la OMS del año 2000, una densidad superior al 4% en pacientes no inmunes debe considerarse hiperparasitemia y

todas las malaras con una parasitemia superior al 20% deben valorarse como potencialmente graves, con independencia de otros factores clínicos y epidemiológicos.

4.2.1. Pruebas rápidas para el diagnóstico de la malaria (PRD)

Sinonimia: MDRT, MRT, RDT, PRD, pruebas de detección de antígenos palúdicos.

Existen numerosas PRD, aunque los principios de funcionamiento son similares. Las PRD detectan antígenos específicos (proteínas) que producen los plasmodios y están presentes en la sangre de individuos infectados o de los individuos infectados que recibieron tratamiento recientemente (en las 4 semanas previas). Algunas PRD detectan solo un antígeno de *P. falciparum* y otras detectan también un antígeno panmalárico común a todas las especies.

La sensibilidad de las PRD en el diagnóstico de las especies de *Plasmodium* no *falciparum* es baja y un test negativo no descarta una malaria por una especie distinta de *P. falciparum*. Por este motivo, y también para cuantificar la parasitemia, debe realizarse siempre también la técnica de referencia que es la microscopía. No obstante, en los países endémicos de renta baja, la situación es muy distinta y actualmente las PRD se utilizan ampliamente como única técnica diagnóstica ante la imposibilidad en muchos casos de contar con microscopía experta en la mayoría de los casos. Las nuevas estrategias de tratamiento de la malaria en África recomendadas por la mayoría de los expertos incluyen el uso de tratamientos combinados con artemisininas y el diagnóstico previo con PRD, que actualmente se están utilizando de forma masiva en algunos países africanos.

Principio de funcionamiento: los antígenos palúdicos se detectan mediante inmunocromatografía en una tira de nitrocelulosa o tarjeta que incorpora bandas de anticuerpos monoclonales específicos. Su fundamento se recoge en la figura 4.

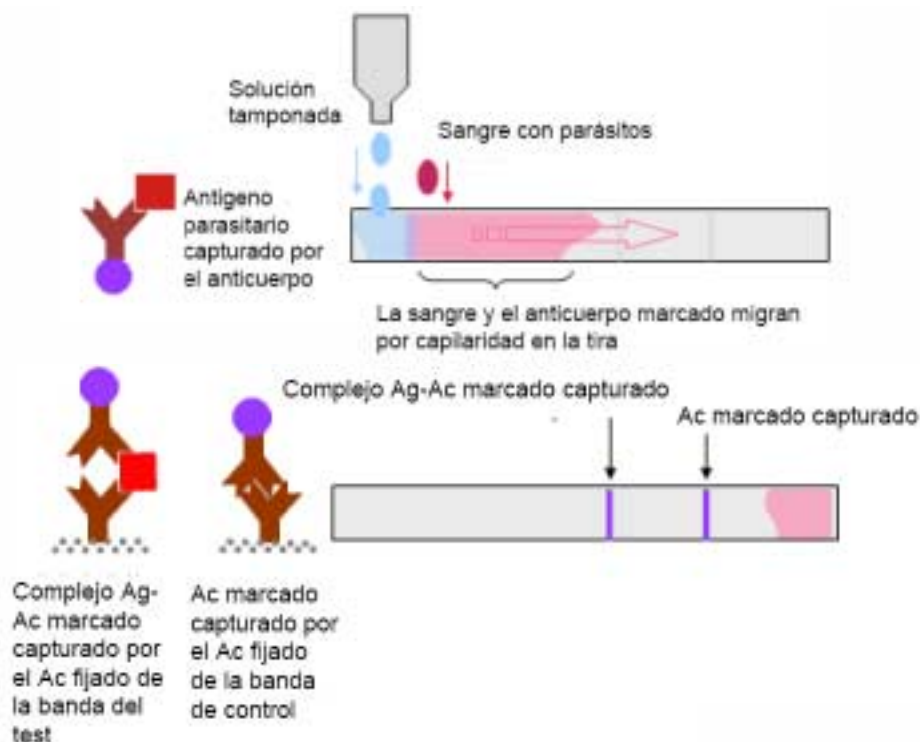


Figura 4. Fundamento de la técnica de inmunocromatografía

Las PRD se dividen básicamente en dos grupos según el antígeno principal detectado:

- A) La proteína rica en histidina II (HRP-2) producida por *P. falciparum*. Algunos kits añaden actualmente una segunda banda para detectar aldolasa, una enzima producida por todos los plasmodios.
- B) La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) producida por *P. falciparum* (PfLDH). Estos kits suelen incorporar también la LDH producida por todas las especies de *Plasmodium* (PLDH).

Las PRD distinguen *P. falciparum* del resto de las especies, pero no pueden diferenciar entre *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*. En general, las PRD deben ser rápidas (< 20 minutos), de fácil uso, con una cantidad mínima de pasos y reactivos, reproducibles y, en la infección por *P. falciparum*, deben detectar densidades de al menos 100 parásitos/μl o tener una sensibilidad mínima del 95% en comparación con la microscopía experta. En el diagnóstico de la malaria importada en los países no endémicos se recomienda que la sensibilidad sea similar a la que se obtiene con la microscopía experta (20-50 parásitos/microlitro) y que permitan detectar también otras especies de malaria. Por otro lado, la capacidad de evaluar la respuesta al tratamiento, el coste y la estabilidad a temperaturas altas, a diferencia de lo que sucede en la mayoría de los países endémicos, no son una prioridad absoluta en los laboratorios de los países más avanzados.

La OMS ha publicado una lista con las PRD de fabricantes y distribuidores que cumplen la norma ISO13485:2003 y una evaluación inicial comparativa de los productos comercializados (<http://www.wpro.who.int/sites/rdt>). En la tabla 11 se presentan los estudios más relevantes realizados con PRD.

En general, puede afirmarse que los kits que detectan HRP-2 son algo más sensibles que los basados en PfLDH para el diagnóstico de la infección por *P. falciparum*. En la detección de *P. vivax*, la determinación de aldolasa y PLDH muestran una sensibilidad similar. No existen datos suficientes para evaluar los resultados con *P. ovale* ni *P. malariae*.

Otros usos de las PRD:

Diagnóstico en gestantes. Debido al secuestro placentario de los parásitos, en el diagnóstico de malaria en gestantes, las PRD que detectan HRP-2 son más sensibles que la microscopía.

Diagnóstico retrospectivo o remoto. La persistencia del antígeno HRP-2 puede ser útil para confirmar un diagnóstico previo de malaria en pacientes tratados de forma empírica en muestras de sangre extraídas hasta 14-21 días después de finalizar el tratamiento o de la resolución de los síntomas.

Usos no recomendados de las PRD:

Autodiagnóstico en viajeros. Algunas PRD (OptiMal-IT y DiaMed AG) presentan envases para uso individual para autodiagnóstico en viajeros, sin embargo, actualmente no se recomienda el uso de estos kits por personal no sanitario en los viajes porque en algunos estudios realizados con un número limitado de pacientes los resultados no fueron satisfactorios.

Tabla 11. Estudios clave en la evaluación de las PRD (Adaptado de Murray y cols., Clin Microbiolog Rev 2008).

PRODUCTO	Antígenos	Sensibilidad (%)		Especificidad (%) Ambos plasmodios	Patrón de referencia	Tipo y lugar de estudio
		P. falciparum	P. vivax			
BinaxNOW Malaria (BinaxInc.)*	HRP-2 y Aldolasa	95 %	69 %	94 %	Microscopía de campo, dos microscopistas certificados	Tailandia , 565 <i>P. falciparum</i> (+), 1.202 <i>P. vivax</i> (+), 2.315 (-)
BinaxNOW Malaria (BinaxInc.)*	HRP-2 y Aldolasa	96%	86,7%	98,7%	PCR	Viajeros con síntomas, Toronto, 106 <i>P. falciparum</i> (+), 103 no <i>P. falciparum</i> (+), 47 (-)
OptiMAL-IT (DiaMed AG)	PfLDH y PLDH	83,6%	91%	97,8%	Microscopía de campo, un microscopista	Colombia, 139 <i>P. falciparum</i> (+), 279 <i>P. vivax</i> (+), 465 (-)
OptiMAL-IT (DiaMed AG)	PfLDH y PLDH	84,3%	84,6%	98,4%	Microscopía en hospital, dos microscopistas	Viajeros sintomáticos , Francia, 80 <i>P. falciparum</i> (+), 13 <i>P. vivax</i> (+), 457 (-)
CareStart Malaria test(AccessBio Inc.)	PfLDH y PLDH	95,6%	92,3%	94,1%	Microscopía de campo, un microscopista	Madagascar, 72 <i>P. falciparum</i> (+), 9 <i>P. vivax</i> (+), 104 (-)
SD malaria antigen bioline(Standard Diagnostics)	PfLDH y PLDH	89,4%	73,3%	91%	Microscopía de campo, un microscopista	Madagascar, 72 <i>P. falciparum</i> (+), 9 <i>P. vivax</i> (+), 104 (-)
<i>P. falciparum</i> -only testsParacheck Pf (Orchid Biomedical Systems)	HRP-2	97,2%	ND	88,8%	Microscopía en hospital, un microscopista	Uganda, 423 (+) <i>P. falciparum</i> , 303 (-)
* PRD aprobada en 2007 por la Food and Drug Administration norteamericana; ND: no disponible						

Control de tratamiento. La microscopía es el único método fiable para controlar la eficacia del tratamiento. Las PRD no se utilizan para controlar el tratamiento porque el antígeno HRP-2 puede permanecer positivo hasta 4 semanas después de desaparecer los síntomas clínicos; por otro lado, aunque las formas asexuales del parásito de la sangre, la aldolasa y la pLDH disminuyen rápidamente con un tratamiento eficaz, pueden ser expresadas por los gametocitos y estos, dependiendo del tratamiento utilizado, pueden persistir una o dos semanas en la circulación sanguínea tras la resolución de los síntomas clínicos.

4.2.2. Diagnóstico microscópico

Gota gruesa. El examen microscópico de la gota gruesa es la técnica de referencia para determinar la parasitemia y permite detectar densidades de hasta 5 - 20 parásitos/microlitro (0,0001%), evaluar el estadio de los parásitos circulantes (trofozoítos, esquizontes, gametocitos) y, en muchos casos, también permite determinar la especie infectante. La parasitemia puede tener valor pronóstico y es un factor relevante junto con los datos clínicos y de laboratorio para adoptar decisiones terapéuticas como la vía de administración y el fármaco más adecuados a cada paciente y si el tratamiento será ambulatorio o en el hospital; además, el estudio seriado de la parasitemia permite controlar la eficacia del tratamiento y la aparición de resistencias.

No obstante, la gota gruesa es una técnica que requiere microscopistas expertos y un estricto control de calidad. Varios estudios han demostrado la variabilidad de los resultados según el observador y la calidad de la tinción, incluso en pacientes con parasitemias relativamente elevadas. Este problema es insoluble por ahora en muchos países endémicos de renta baja por la falta de personal sanitario entrenado; en los países avanzados, en general, la microscopía experta solo está disponible en centros que atienden con frecuencia infecciones importadas y en franjas horarias limitadas.

Extensión fina. Esta técnica permite visualizar bien los hematíes parasitados y los plasmodios en sus diferentes fases de crecimiento y facilita la identificación de la especie, lo cual es necesario, por ejemplo, para añadir primaquina al tratamiento en las infecciones por *P. ovale* y *P. vivax*. Es una técnica 30 veces menos sensible que la gota gruesa y no debe emplearse de forma aislada en el diagnóstico de la malaria.

4.2.3. Procedimientos alternativos adicionales.

Los siguientes procedimientos alternativos válidos o adicionales pueden estar indicados en situaciones especiales.

- La PCR múltiple es una herramienta diagnóstica complementaria que se utiliza en la práctica clínica de forma retrospectiva para confirmar el diagnóstico de infecciones con parasitemias muy bajas en pacientes con antígenos positivos y gota gruesa negativa; para detectar infecciones oligo o asintomáticas en pacientes con antígenos palúdicos y gota gruesa negativa (situación no infrecuente en pacientes

infectados por el VIH); y para detectar parasitemias mixtas en casos de difícil interpretación de las pruebas microscópicas. Otro aspecto relevante del diagnóstico por PCR es la utilidad en los procesos de control de calidad de la microscopía y las pruebas rápidas. Recientemente se han comercializado reactivos de PCR a tiempo real para malaria. Debido al coste y equipamiento necesario para realizar estas pruebas y la falta de experiencia clínica, todavía no puede recomendarse su uso generalizado.

- Las técnicas serológicas para detección de anticuerpos antipalúdicos de inmunofluorescencia indirecta y ELISA se emplean sobre todo en estudios epidemiológicos. El interés en la práctica clínica se limita al diagnóstico retrospectivo cuando se desea confirmar el diagnóstico previo en pacientes no inmunes que sufrieron un proceso febril durante un viaje.

- La microscopía de fluorescencia permite identificar parásitos de malaria en sangre periférica con la tinción de naranja de acridina de gotas gruesas o extensiones finas o mediante la técnica de QBC (*Quantitative Buffy Coat*) realizada con un tubo de hematocrito. Es una técnica que rara vez se usa en países más avanzados por la inespecificidad de la tinción fluorescente ni en los países de renta baja por el precio y la dificultad del mantenimiento de los equipos de fluorescencia, aunque la reciente comercialización de microscopios equipados de lámparas LED (diodos emisores de luz) robustas, económicas y duraderas podría aumentar el interés de esta técnica.

4.2.4. Procedimientos no recomendados

- La gota gruesa no debe realizarse en laboratorios sin experiencia.

- La extensión fina no debe utilizarse como única prueba diagnóstica por su baja sensibilidad aunque sí detectaría los casos con alta parasitemia.

- En zonas no endémicas, no deben utilizarse los antígenos como única herramienta diagnóstica por la posibilidad de falsos negativos (especialmente en infecciones por *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* o *P. knowlesi*) y falsos positivos (infecciones previas tratadas, presencia de factor reumatoide).

- Las PRD no deben utilizarse para controlar la eficacia del tratamiento.

- En la gota gruesa de control del tratamiento debe valorarse exclusivamente la presencia de trofozoítos. La existencia de gametocitos en un paciente tratado previamente no indica fracaso terapéutico y es normal que aparezcan incluso semanas después de un tratamiento eficaz. Por otro lado, su persistencia varios meses después del último tratamiento sí indicaría la existencia de ciclo eritocítico activo y el paciente debería tratarse si tiene síntomas o si ya no reside en zona endémica.

4.3. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LA LEISHMANIASIS

Aunque es una enfermedad autóctona en España dada la variedad de especies y formas clínicas y su importancia se ha considerado necesario incorporarla a este documento.

4.3.1. Consideraciones generales. Bajo el nombre de leishmaniasis se engloba un grupo de enfermedades que cursan como úlceras cutáneas o como graves afectaciones viscerales. Entre estos dos polos hay una amplia gama de posibilidades clínicas. Todas ellas tienen en común el estar causadas por protozoos flagelados pertenecientes a la clase Kinetoplastida y al género *Leishmania*. Al menos existen dos docenas de especies patógenas de *Leishmania* que son transmitidas por la picadura de las hembras hematófagas infectadas de alrededor de 30 especies de dípteros de los géneros *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo. Hay un grado de correlación entre la especie de *Leishmania* y la forma/evolución clínica, las especies de flebotomos encargadas de su transmisión y los diferentes mamíferos a los que puede parasitar (roedores, primates, carnívoros, marsupiales, etc.). El parásito 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 retículo-endotelial del hospedador vertebrado.

Las leishmaniasis aparecen en todos los continentes, excepto Australia, y son endémicas en las regiones tropicales y subtropicales de 88 países, con una prevalencia de 12 millones de enfermos y una incidencia de unos dos millones de casos nuevos anuales, de ellos 500.000 viscerales y casi 1.500.000 cutáneos. Las leishmaniasis se asocian con una pérdida de años de vida saludable de aproximadamente 2,4 millones y alrededor de 50.000 personas mueren al año de leishmaniasis visceral (LV), una tasa de mortalidad que, en el caso de las enfermedades parasitarias, sólo es superada por la malaria. La población en riesgo se eleva a 368 millones de personas. Es una de las cinco parasitosis más importantes y pertenece al grupo de las llamadas enfermedades olvidadas debido a su amplia distribución, incidencia y dificultad de control (www.who.int/tdr).

La prevalencia mundial de la leishmaniasis ha aumentado en los últimos 20 años ya que se detectan casos autóctonos en zonas hasta ahora libres de la enfermedad como el norte de Italia y el sur de Alemania y, además, debido a la mejora de los métodos de diagnóstico y de los sistemas de vigilancia que reportan un mayor número de enfermos. El incremento global de casos se debe también a otros factores como: el control inadecuado de vectores y reservorios; la urbanización y deforestación; la asociación con infecciones oportunistas como en el caso de la coinfección con el VIH/SIDA; la aparición de resistencias a los fármacos anti-*Leishmania*; la malnutrición y la pobreza; los

conflictos armados y el aumento de los viajes internacionales por trabajo o turismo. Además, el calentamiento global del planeta está modificando la distribución geográfica de los vectores involucrados en la leishmaniasis lo que podría llevar a que se estableciera la transmisión en regiones no endémicas.

Desde 1985, cuando se publicó el primer caso de leishmaniasis asociada a infección por el VIH, el número de casos de coinfección fue aumentando rápidamente en el sur de Europa, detectándose hasta la fecha casos en 35 de los 88 países donde la leishmaniasis es endémica. A partir de la introducción de la terapia antirretrovírica de gran actividad (TARGA) se ha observado una marcada disminución en la incidencia de casos de coinfección en Europa, como resultado de la restauración parcial de la inmunidad, con la excepción de Portugal. Sin embargo, el problema se ha extendido a otros importantes focos de leishmaniasis en el mundo debido al solapamiento de ambas infecciones. La pandemia de VIH/SIDA ha modificado la historia natural de la leishmaniasis. La infección por el VIH aumenta el riesgo de desarrollar una LV en las áreas endémicas, reduce las expectativas de una respuesta terapéutica adecuada e incrementa la probabilidad de recaídas. La coinfección *Leishmania*/VIH se comunica actualmente en el 2-9% de todos los casos de LV, una proporción que es probable que aumente dramáticamente. En poblaciones seleccionadas, como es el caso de Humera, en Etiopía, la tasa de coinfección en los pacientes con LV es del 15% al 30%.

En España, *L. infantum* es el agente causal de las leishmaniasis cutáneas (LC) y viscerales, con una distribución típicamente rural y periurbana. Se notifican unos 120 casos por año, lo que significa 0,3 casos cada 100.000 habitantes, es decir, se trata de una enfermedad hipoendémica. No obstante, las leishmaniasis son de declaración obligatoria anual en sólo 12 de las 17 Comunidades Autónomas y hay una evidente subdeclaración. Hasta 1985, la mayoría de los casos de LV se daban en niños inmunocompetentes, desde entonces este porcentaje se ha invertido y hasta el 80% de los casos de LV está relacionado con adultos inmunodeprimidos, en su gran mayoría infectados por el VIH.

4.3.2. Diagnóstico de la leishmaniasis mediante exámen microscópico. El diagnóstico de certeza de una leishmaniasis se realiza por observación directa de los parásitos. Las técnicas microscópicas son baratas y de fácil manejo pero requieren un entrenamiento adecuado. La combinación con técnicas de inmunohistoquímica como la inmunoperoxidasa o la tinción con anticuerpos monoclonales fluorescentes aumentan la sensibilidad. Los métodos clásicos de tinción son: Giemsa, hematoxilina-eosina y Leishman. En las LC la observación microscópica es la técnica más empleada. La sensibilidad varía entre el 50%-80% según diferentes autores y el procedimiento empleado. En el caso de las lesiones crónicas como

la leishmaniasis cutánea recidivante y la LMC, el rendimiento de la microscopía es muy bajo ya que suele haber muy pocos parásitos en las lesiones. La detección microscópica de amastigotes en material de biopsia o en el aspirado de médula ósea teñido con Giemsa es el "patrón oro" en el diagnóstico de la LV con una sensibilidad del 64%-94% tanto en pacientes inmunocompetentes como en coinfectados con el VIH. En estos últimos, la observación de amastigotes en extensiones de sangre periférica alcanza una sensibilidad de aproximadamente el 50%. Además, es posible encontrar amastigotes, en este tipo de pacientes, en localizaciones inusuales como pulmones, laringe, amígdalas, tracto digestivo, recto, líquido cefalorraquídeo y otros.

4.3.3. El cultivo de *Leishmania* spp. Parte del material de la biopsia, convenientemente triturado en condiciones estériles, o del aspirado se puede cultivar en medio específico NNN (Novy-Nicolle-McNeal) en los casos en los que se desee aislar la cepa para su caracterización bioquímica, para realizar estudios epidemiológicos, pruebas de susceptibilidad a fármacos y con fines diagnósticos cuando haya alta sospecha clínica y no haya sido detectado el parásito por otros métodos. Los cultivos se incuban a 27°C o, en su defecto, a temperatura ambiente, se examinan semanalmente en busca de promastigotes y se resiembran en medio fresco. Pueden descartarse como negativos si no aparecen flagelados después de cuatro semanas. En las LC la sensibilidad varía entre el 50% y el 60% y disminuye en los casos crónicos y en la LMC; es frecuente la contaminación con bacterias y hongos. En la LV la sensibilidad del cultivo de médula ósea en pacientes inmunocompetentes es del 53-70% y en coinfectados varía del 50% al 100%. En estos enfermos el cultivo de células mononucleares de sangre periférica tiene una sensibilidad del 64% al 67%. Uno de los hechos más característicos de las leishmaniasis en los enfermos coinfectados es su tendencia a las recidivas, de modo que terminan por rechazar nuevas punciones de médula para el control parasitológico de las mismas. Por tanto, la elección de una biopsia no invasiva como la sangre, resulta extraordinariamente útil en el diagnóstico de leishmaniasis en estos pacientes.

Recientemente, se ha descrito un método de microcultivo en tubo capilar para el aislamiento de *Leishmania* spp., consistente en mezclar a partes iguales la muestra biológica y el medio de cultivo utilizado (RPMI 1640, Schneider, NNN). Este método ha resultado ser más sensible y rápido que el cultivo tradicional en el diagnóstico de las LC causadas por *L. tropica* en Turquía y por especies del subgénero *Viannia* en Perú y de la LV originada por *L. infantum*, también en Turquía. La detección de promastigotes por microcultivo requiere, por tanto, menor cantidad de muestra y medio de cultivo y periodos de incubación menores que el cultivo tradicional.

4.3.4. Diagnóstico molecular de la leishmaniasis. Existen numerosos protocolos de PCR para la detección de ADN de *Leishmania* spp. en una amplia variedad de muestras clínicas (médula ósea, sangre

periférica, ganglio linfático, piel, y otras). La máxima sensibilidad se consigue al utilizar secuencias multicopia como diana como el ARN de la subunidad pequeña ribosomal y el ADN del kinetoplasto (kDNA). Permiten la detección altamente sensible y específica de los parásitos del género *Leishmania*, independientemente de la especie. En el diagnóstico de la LC y LMC, la PCR mejora los resultados obtenidos por la microscopía y el cultivo, alcanzando un 100% de sensibilidad y en la LV, la sensibilidad de esta técnica en el estudio de médula ósea es muy elevada, oscilando entre un 82% y un 100%. Ha supuesto un gran avance en el diagnóstico de la LV a partir de sangre periférica, ya que presenta una gran sensibilidad, en torno al 70%-100% en esta muestra poco invasiva, en comparación con el resto de técnicas diagnósticas y, en especial, en el caso de los pacientes coinfectados. Además, mediante PCR es posible caracterizar de manera rápida el parásito presente en una muestra biológica en el nivel taxonómico de complejo, especie o incluso aislado individual, evitando los inconvenientes de las técnicas clásicas de identificación y caracterización, lo que puede ser muy útil para el manejo clínico de los pacientes.

Recientemente, se ha desarrollado un método de oligocromatografía-PCR para visualizar de forma rápida los productos de PCR sin necesidad de utilizar geles de agarosa y bromuro de etidio, que se encuentra ya disponible en el mercado. El amplicón se detecta en un *dipstick* mediante la hibridación con una sonda conjugada con oro y una ventaja adicional es que el *dipstick* puede incorporar controles internos de PCR.

La PCR cuantitativa en tiempo real (RTQ-PCR) permite la monitorización continua de los productos de PCR generados durante el proceso de amplificación mediante tinción con SYBR-green I o hibridación con sondas fluorescentes (TaqMan). Se han desarrollado diversos protocolos de RTQ-PCR para leishmaniasis que utilizan como dianas: la región conservada de los minicírculos de kDNA, el ARNr 18S y el ARNr de la subunidad pequeña del ribosoma. Las ventajas, en comparación con la PCR clásica, son la reducción del tiempo del ensayo y la posibilidad de determinar la carga parasitaria de la muestra estudiada, que permite su aplicación en el estudio de la eficacia de tratamientos y vacunas, el apoyo al diagnóstico y en el seguimiento de los pacientes coinfectados para confirmar las recaídas.

4.3.5. Diagnóstico serológico de la leishmaniasis. En cuanto a la detección de la respuesta inmune humoral, durante un proceso activo de LV pueden encontrarse títulos elevados de anticuerpos anti-*Leishmania*. Las técnicas serológicas poseen considerables ventajas, habiéndose desarrollado un elevado número de ellas, incluyendo inmunofluorescencia indirecta (IFI), enzoinmunoensayo, aglutinación directa, y una gran variedad de métodos de *immunoblot*. No obstante, la mayoría de estos ensayos presentan una serie de limitaciones. En primer lugar, aunque los títulos de anticuerpos decaen tras el tratamiento,

permanecen detectables durante varios años después de la curación. Por tanto, en el caso de la LV las recaídas no se pueden diagnosticar mediante técnicas serológicas. En segundo lugar, una proporción significativa de individuos sanos de áreas endémicas y sin historia previa de LV presentan anticuerpos anti-*Leishmania* debido a infecciones asintomáticas. La seroprevalencia en poblaciones sanas varía desde menos del 10% en áreas de baja a moderada endemidad, a más del 30% en focos de alta transmisión o entre los contactos de un caso clínico. Por lo tanto, la mayoría de las pruebas serológicas son incapaces de discriminar entre infecciones subclínicas, activas y pasadas y por ello se deben utilizar siempre en combinación con una definición estandarizada de caso clínico para el diagnóstico de la LV. Por último, pueden presentar reacciones cruzadas con enfermedad de Chagas, enfermedad del sueño, lepra, malaria, esquistosomiasis, lupus eritematoso, sífilis y con algunos procesos autoinmunes. En nuestro entorno, la IFI es la técnica serológica de referencia considerándose positivos aquellos sueros con un título de anticuerpos $\geq 1/80$. En la coinfección *Leishmania*/VIH la respuesta humoral específica a *Leishmania* resulta parcial, débil o ausente, debido a que la inmunidad celular se encuentra afectada tras la infección por el VIH y la serología es positiva sólo en el 40%-50% de los pacientes coinfectados.

Se han comercializado varias pruebas inmunocromatográficas (ICTs) que utilizan el antígeno recombinante rK39 y se encuentran disponibles en el mercado español. Se ha postulado que este antígeno podría ser un indicador serológico de enfermedad ya que los anticuerpos frente al rK39 se detectan durante la enfermedad activa y en los casos subclínicos que progresan a LV, adelantándose a los síntomas de la misma. Sin embargo, en estudios realizados en Brasil, Sudán e India se obtienen resultados positivos durante 24 meses después del tratamiento. Un meta-análisis reciente que incluyó 13 estudios validados del *disptick* rK39 mostró unas estimaciones de sensibilidad y especificidad del 94% y 95%, respectivamente. Los ICTs rK39 son fáciles de realizar, rápidos (10-20 minutos), baratos y reproducibles. Actualmente son las mejores herramientas de diagnóstico de la LV disponibles para ser utilizadas en áreas remotas y se debería promover su distribución y utilización en un algoritmo apropiado de diagnóstico de la LV en zonas endémicas.

4.3.6. Métodos de detección de antígeno de *Leishmania* spp. Teóricamente, las pruebas de detección de antígeno deberían ser más específicas que las de detección de anticuerpos ya que evitan la reactividad cruzada y pueden distinguir infecciones activas de pasadas. Recientemente se cuenta con un nuevo ensayo de aglutinación para la detección de antígeno de *Leishmania* spp. en orina, una muestra no invasiva y fácil de obtener que está comercializado con el nombre de KAtex. Se trata de una prueba de aglutinación con látex que detecta un

antígeno carbohidrato de bajo peso molecular, estable al calor, en la orina de los pacientes con LV. Varios estudios llevados a cabo en África y en el subcontinente indio mostraron una buena especificidad, del 84% al 100%, y una sensibilidad moderada que oscila entre 48% y 87%. La secreción de antígeno en orina se espera que dependa del estado de la enfermedad y de los niveles de parasitemia, y de ahí la variabilidad de la sensibilidad del KAtex en diferentes grupos de pacientes. Un aspecto interesante de esta nueva metodología es que parece ser un buen indicador de leishmaniasis activa ya que se ha comprobado que la antigenuria se vuelve negativa después de un tratamiento con éxito y, además, es ajeno a la situación inmunológica del paciente.

Los métodos de detección de antígeno son útiles en el diagnóstico de enfermedades infecciosas en pacientes con una producción deficiente de anticuerpos, como es el caso de los pacientes coinfectados y en la evaluación de la eficacia del tratamiento. El KAtex ha demostrado ser altamente sensible durante los episodios clínicos, cuando la carga parasitaria es alta. En dos estudios realizados en España, encuentran una sensibilidad del 85,7% y 100% respectivamente y una especificidad del 96% en el segundo estudio.

Se ha propuesto la utilización del KAtex como una herramienta útil para monitorizar la eficacia del tratamiento ya que la antigenuria se negativizaba tras el tratamiento con éxito y no se observaron recaídas en la mayoría de estos pacientes, el KAtex detectó antígenos de *Leishmania* spp. en los periodos asintomáticos entre recaídas indicando infección subclínica y esta prueba resultó ser negativa en pacientes coinfectados que se consideraban curados (sin amastigotes en los aspirados de médula ósea o en sangre después del tratamiento).

4.4. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS (TRIPANOSOMIASIS AMERICANA)

4.4.1. Consideraciones generales. Para realizar un diagnóstico de laboratorio adecuado es necesario disponer de la información clínico-epidemiológica que indique la etapa de la infección en la que podría encontrarse el paciente. En el caso de una infección aguda o reciente se utilizarán técnicas de detección del parásito, mientras que si el individuo se encuentra en la etapa crónica, el diagnóstico se basará, fundamentalmente, en la determinación de anticuerpos específicos anti-*T. cruzi*. No obstante, para realizar el seguimiento de la infección en un paciente, tanto si ha recibido tratamiento como si no, es necesario llevar a cabo los dos tipos de determinaciones mencionadas.

4.4.2. Diagnóstico de la tripanosomiasis americana mediante microscopía. El diagnóstico de certeza consiste en la demostración del parásito. Durante la fase aguda, los tripomastigotes son abundantes en sangre periférica y su detección se realiza mediante pruebas parasitológicas directas como la observación microscópica en fresco, tinción

Giemsa de gota gruesa o frotis sanguíneos o la observación después de realizar la prueba de Strout. Este último procedimiento consiste en concentrar los parásitos a partir de 3 ml de sangre recogida sin anticoagulante mediante incubación a 37°C durante 1 h para que se retraiga el coágulo y los tripomastigotes queden suspendidos en el sobrenadante. Tras varios ciclos de centrifugación, el sedimento se observa a 400 aumentos. El método del tubo capilar heparinizado o microhematocrito es otra técnica de concentración que mejora el redimiendo de la microscopía convencional y resulta de gran utilidad para el diagnóstico de las infecciones congénitas. Esta prueba consiste en el análisis del movimiento de los parásitos en la interfase entre el paquete de hematíes y el plasma de 4 a 6 capilares.

4.4.3. Métodos diagnósticos indirectos: xenodiagnóstico y cultivo. En la fase crónica, la detección de *T. cruzi* es difícil porque el número de parásitos circulantes es muy bajo y se recomienda utilizar métodos parasitológicos indirectos como el xenodiagnóstico y el hemocultivo que permiten amplificar la presencia del parásito. El primero, consiste en la aplicación de triatomíneos de colonias de laboratorio en el antebrazo o las piernas del paciente para que ingurgiten sangre y mensualmente examinar la presencia de tripomastigotes metacíclicos en su contenido rectal, durante un periodo de tres meses. Actualmente se puede realizar de forma artificial, exponiendo la sangre del paciente, y evitando así la exposición directa del paciente a los triatomíneos. La detección de los parásitos por PCR ha conseguido aumentar la sensibilidad del xenodiagnóstico y reducir el tiempo de duración de la prueba a 30 días.

Durante la fase aguda se puede realizar el hemocultivo sembrando volúmenes pequeños de muestra en medio NNN tradicional. En la etapa crónica es necesario utilizar hasta 30 ml de sangre para obtener un rendimiento óptimo. La sangre recogida con anticoagulante se centrifuga en un plazo de 4-8 h para separar el paquete de hematíes y el plasma que contiene las células blancas y las plaquetas. Los hematíes después de un lavado con medio LIT (*liver infusion tryptose*) se distribuyen en 6 tubos que contienen 3 ml de medio LIT. Por otro lado, las células suspendidas en el plasma se centrifugan y se cultivan en 3 ml de medio LIT. Los cultivos se incuban a 27°C y se revisan semanalmente mediante observación de una gota en fresco para detectar la presencia de epimastigotes durante un periodo de 6 meses.

Los métodos indirectos, aparte de su interés diagnóstico, son herramientas de gran utilidad para el aislamiento de cepas de *T. cruzi* y posteriores estudios de genética de poblaciones pero, por razones obvias, su utilización se restringe a los laboratorios de referencia.

4.4.4. Métodos basados en la detección de ácidos nucleicos. Existen numerosas dianas moleculares que permiten la detección específica de *T. cruzi*, si bien, la mayoría de los protocolos de PCR que se

utilizan para el diagnóstico de la infección son protocolos no comercializados, puestos a punto en los laboratorios de referencia. Las dianas más utilizadas son el minicirculo del ADN del kinetoplasto y la secuencia repetida de ADN satélite. Como ambas se encuentran representadas en un número de copias muy similar (10^4 copias), las diferencias en el límite de detección dependen de la optimización de cada reacción. En ambos protocolos de PCR, es posible conseguir la detección inequívoca del contenido genómico de un solo parásito por mililitro de muestra, e incluso cantidades inferiores. En general, el límite de detección depende del número de repeticiones de la secuencia diana de amplificación, las condiciones de la reacción, la variabilidad de la parasitemia, y el tipo y cantidad de muestra biológica. En la fase aguda es una herramienta diagnóstica más sensible que los métodos parasitológicos tradicionales mientras que en la fase crónica, la PCR es una prueba complementaria y es útil como criterio parasitológico de seguimiento del tratamiento tripanocida. Hay que destacar que algunos individuos infectados en fase crónica tienen parasitemias persistentes, pero en muchos es posible que se alternen resultados positivos con negativos. Mientras que un resultado de PCR positivo confirma la infección, un resultado negativo con serología positiva no necesariamente indica ausencia de parasitación.

La PCR cuantitativa en tiempo real todavía no está muy introducida en el diagnóstico habitual, debido a que la determinación de la carga parasitaria es útil, principalmente, en la etapa aguda. Su utilización en el diagnóstico de la infección crónica tiene las mismas limitaciones que una PCR tradicional. No obstante, mediante esta metodología se reduce el tiempo de visualización de los productos de la reacción, ya que la amplificación y la detección se realizan en un solo paso, y el riesgo de contaminación es menor como consecuencia de la mínima manipulación de las muestras. Algunos protocolos de PCR tradicional de diagnóstico ya se han adaptado a esta tecnología pero todavía es necesario estudiar con detenimiento sus ventajas.

4.4.5. Diagnóstico serológico de la tripanosomiasis americana. La enfermedad de Chagas se caracteriza por la aparición cronológica de distintas clases de anticuerpos específicos durante la infección. Al comienzo de la misma se detectan anticuerpos del tipo IgM que desaparecerán precozmente, seguidas de IgG que permanecen toda la vida si no hay tratamiento. La detección de anticuerpos frente a *T. cruzi* mediante métodos serológicos, es una de las principales herramientas de diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Entre las técnicas convencionales se encuentran la inmunofluorescencia indirecta, la hemaglutinación indirecta y el ELISA, denominadas así porque utilizan parásitos completos o fracciones antigénicas complejas o semipurificadas de epimastigotes de *T. cruzi* (la forma no infectiva del parásito). Estos métodos serológicos convencionales son altamente sensibles, pero presentan reacciones cruzadas con

anticuerpos frente a otras patologías: leishmaniasis visceral y mucocutánea, malaria, sífilis, toxoplasmosis, hepatitis, lupus eritematoso sistémico, esquistosomiasis, artritis reumatoide, paracoccidiodomicosis, mononucleosis y enfermedades autoinmunes. Las técnicas serológicas no convencionales son aquellas que utilizan antígenos purificados, recombinantes o péptidos sintéticos (OMS, 2003). En general, los antígenos recombinantes han supuesto un claro avance en lo que se refiere a especificidad frente a los extractos crudos del parásito. Dentro de este último grupo, destacan las pruebas rápidas en formato de tiras inmunocromatográficas que permiten obtener un resultado en 10-15 minutos.

A pesar de los avances tecnológicos, ningún ensayo serológico alcanza el 100% de sensibilidad y especificidad, de manera que el diagnóstico serológico de certeza se basa en la concordancia de, al menos, 2 técnicas de distinto principio y antígenos diferentes (OMS, 2003). Cuando los resultados son discordantes, es necesario realizar otra prueba de confirmación y diagnóstico diferencial con otras enfermedades que pueden dar lugar a reacciones falsamente positivas.

Actualmente, se pueden encontrar en el mercado numerosos juegos de reactivos comerciales para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*, que se basan tanto en antígenos totales como en antígenos recombinantes. A la hora de elegir una u otra técnica, es necesario considerar el objetivo del estudio y la infraestructura disponible y, a continuación, seguir estrictamente las instrucciones del fabricante. En cribados serológicos se debe optar por la técnica de mayor sensibilidad, por lo general en formato de ELISA. En cambio, para el diagnóstico es conveniente combinar los ensayos convencionales entre sí, o con alguno de los métodos no convencionales de mayor especificidad. La mayoría de las pruebas no convencionales, disponibles en el mercado español, se basan en epítomos antigénicos muy similares, por lo que la utilización de dos de estos reactivos para confirmar un diagnóstico no cumpliría la recomendación de la OMS, que es utilizar pruebas de principios distintos. Las pruebas inmunocromatográficas presentan, en general, una menor sensibilidad pero pueden resultar útiles en determinadas circunstancias que requieran una actuación inmediata por su sencillez y rapidez de ejecución.

4.5. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDADE DEL SUEÑO (TRIPANOSOMIASIS AFRICANA)

4.5.1. Consideraciones generales. La tripanosomiasis africana (TA) es una enfermedad propia del África subsahariana donde existen múltiples pequeños focos endémicos. En el pasado

lustro se han descrito sólo 11 casos importados en Europa (expatriados, turistas o inmigrantes). No hay registros fiables de su incidencia o prevalencia pero se estima en decenas de miles o incluso centenares de miles. Esta enfermedad tiene dos variedades con diferencias clínicas y epidemiológicas:

a) La causada por *Trypanosoma brucei rhodesiense* se distribuye fundamentalmente por el este de África (Figura 5), la transmiten moscas tse-tse del grupo *Glossina morsitans* y es una antropozoonosis que afecta también a antílopes y al ganado vacuno y que tiende a aparecer en forma de pequeños brotes epidémicos. La presentación clínica característica es aguda, con fiebre alta y una lesión inflamatoria en la zona de picadura del vector. El trypanosoma se puede visualizar en dicho chancro de inoculación o en la sangre donde suele haber alta parasitemia.

b) El *Trypanosoma brucei gambiense* se distribuye por el oeste de África, lo transmiten tse-tse del grupo *Glossina palpalis* y el principal reservorio es humano, y representa la gran mayoría de los casos declarados de TA. El curso de la enfermedad suele ser crónico, con adenopatías y hepatoesplenomegalia. Por lo tardío de la sospecha clínica el chancro de inoculación suele haber desaparecido y puede tener un discreto exantema y manifestaciones neurológicas incluido insomnio o somnolencia. La parasitemia suele ser baja o indetectable.

Excepcionalmente se ha descrito la parasitación de humanos por otras especies zoonóticas en individuos con deficiencia de la apolipoproteína L-1, que es una proteína sérica con actividad tripanolítica

4.5.2. Diagnóstico de laboratorio de la tripanosomiasis africana. El proceso general es similar al descrito para *T. cruzi*: si la parasitemia es muy alta puede bastar con un examen en fresco de plasma o de sangre anticoagulada, o con una extensión y gota gruesa de las utilizadas para malaria. Para mayor sensibilidad se recomienda el método de Strout, la microcentrifugación o, preferiblemente la centrifugación en minicolumnas de intercambio aniónico. Si hay una adenopatía cervical (signo de Winterbottom) se debe puncionar el ganglio con una aguja, sin jeringa, exprimir el ganglio y examinar el líquido obtenido. El líquido cefalorraquídeo se debe centrifugar 10 min. a 900 xg y examinarse inmediatamente en fresco con el objetivo de 10x. La presencia en biopsias cerebrales de células plasmáticas con cuerpos de inclusión (células de Mott) en un contexto epidemiológico adecuado se considera patognomónico. Para el diagnóstico serológico de campo se emplean tarjetas de aglutinación. Se han desarrollado otras pruebas serológicas y de PCR disponibles en algunos centros de referencia.



Figura 5. Distribución de focos endémicos de tripanosomiasis humana en África (tomado de Stich A et al. ver referencia nº 34). Se observa una destacable discrepancia en el número y localización de los focos entre las distintas publicaciones dependiendo de su fecha de elaboración y fuentes utilizadas por lo que sólo debe ser considerada como orientativa. La línea de puntos establece la distribución aproximada de *T. b. gambiense* (oeste) y *T. b. rhodesiense* (este).

4.6. DIAGNÓSTICO DE LAS FILARIASIS

Las filarias son un grupo de helmintos hemáticos y tisulares muy heterogéneo desde el punto de vista clínico, epidemiológico y de diagnóstico por lo que se expondrán separadamente. A modo de introducción, la Tabla 12 resume algunas de sus principales características.

Modificado a partir de: Bench aids for the diagnosis of filarial infections. O.M.S. 1997

Para examinar imágenes de las diferentes especies pueden consultarse las siguientes láminas de la OMS:

http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/PDF_Files/Introduction_filariasis_who.pdf

http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/PDF_Files/Wbancrofti_Lloa_benchaid_who.pdf

http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/PDF_Files/Brugia_benchaid_who.pdf

http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/PDF_Files/Oncho_Mansonella_benchaid_who.pdf

http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/PDF_Files/Mansonella_benchaid_who.pdf

http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/PDF_Files/Artifacts_benchaid_who.pdf

4.6.1 Diagnóstico de las filariasis linfáticas. Las filarias de los géneros *Wuchereria* y *Brugia* invaden los vasos linfáticos produciendo obstrucción del flujo de la linfa. Las manifestaciones clínicas dependen de la interacción del sistema inmune contra los antígenos de las filarias, y sus bacterias endosimbióticas (*Wolbachia* spp.), del número y localización de filarias adultas, de las sobreinfecciones bacterianas y, en menor medida, de las microfilarias, habiéndose observado una

correlación inversa entre el linfedema y la intensidad de la microfilaremia. Estas bacterias también parecen favorecer la fertilidad o la supervivencia de las filarias adultas.

La parasitación por estas filarias puede ser asintomática, o manifestarse como eosinofilia y reacciones inmunitarias (síndrome de eosinofilia pulmonar tropical) que podría confundirse con asma, episodios febriles agudos sin focalidad (fiebre filarial), como linfangitis aguda, o insuficiencia linfática crónica con un grado variable de linfedema.

Se distribuyen por la mayor parte de las zonas tropicales siendo endémicas en 83 países. India, Indonesia, Nigeria y Bangladesh acumulan el 70% de los casos de filariasis del mundo. En América existen focos activos en Brasil, en la Guayana y en La Española (Haití y República Dominicana). Las estrategias de control de *Wuchereria* spp. se basan en la administración masiva de filaricidas a la población de zonas endémicas de forma periódica durante unos 5 años. A diferencia de la anterior, la erradicación de *Brugia* spp. no se considera un objetivo alcanzable por tener un amplio reservorio animal.

Tabla 12. Características de las principales filarias que afectan al hombre

Especie	<i>Wuchereria bancrofti</i>	<i>Brugia malayi</i>	<i>Brugia timori</i>	<i>Loa loa</i>	<i>Mansonella ozzardi</i>	<i>Mansonella perstans</i>	<i>Mansonella streptocerca</i>	<i>Onchocerca volvulus</i>
Distribución Geográfica	Trópicos y subtrópicos	Subcontinente indio e Indochina	Indonesia y Timor, islas Sunda	África central y del oeste	Centro y Sudamérica	África y Sudamérica	África Central y del Oeste	África y América
Vectores	Mosquitos			<i>Chrysops</i> Tábano	<i>Culicoides</i> <i>Simulium</i>	<i>Culicoides</i>	<i>Culicoides</i>	<i>Simulium</i>
Habitat de adultos	Sistema linfático			Tejido subcutáneo, conjuntiva	Tejido subcutáneo	Sangre	Dermis	Subcutáneo tejidos profundos
Hábitat de microfilarias	Sangre			Sangre	Sangre	No	Piel	
Periodicidad	Nocturna			Diurna	No	No	No	No
Vaina	Sí			Sí	No	No	No	No
Longitud en extensión seca. Rango (media) m	244-296 (260)	177-230 (220)	265-323 (287)	231-250 (238)	163-203 (183)	190-200 (195)	304-315 (309)	180 240 (210)
Longitud fijada: formol 2%. Rango (media) m	275-317 (298)	240-298 (270)	332-383 (358)	270-300 (281)	183-225 (203)	203-254 (224)	-	-

Se transmiten de persona a persona por picadura de mosquitos. Los mosquitos infectados inyectan al picar microfilarias de tercer estadio que, en unos nueve meses, se transforman en adultos en los vasos linfáticos. Estos adultos sobreviven durante unos cinco años (ocasionalmente hasta 15) y cada hembra puede llegar a producir miles de microfilarias al día donde producen larvas de primer estadio. Éstas migran a la sangre durante la noche, donde tienen oportunidad de ser ingeridas por mosquitos cerrando el ciclo. La periodicidad de la presencia de estas microfilarias en sangre es

variable dependiendo de la especie, de la zona geográfica y del ritmo de sueño-vigilia del paciente.

Wuchereria bancrofti se distribuye ampliamente por zonas tropicales y es transmitida por mosquitos de los géneros *Culex*, *Anopheles*, *Aedes*, *Mansonia* y *Coquillettidia*. *Brugia malayi* es transmitida por mosquitos del género *Aedes* y *Mansonia* y está presente en pequeños focos en Asia y en islas del Pacífico mientras que *Brugia timori* sólo se encuentra en algunas islas del este de Indonesia (ver Figura 6).



Figura 6. Zonas endémicas de filariasis linfáticas (Tomado de: *Centers for Disease Control*, Atlanta, Georgia. http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/lymphaticfilariasis/epidemiology_lymphatic_filar.htm)

El diagnóstico de laboratorio se puede realizar mediante la visualización de las microfilarias en sangre, y la detección de anticuerpos o de antígenos circulantes. Los principales inconvenientes de las técnicas serológicas son las reacciones cruzadas, especialmente con *Strongyloides stercoralis*, y la ausencia de un patrón oro con el que comparar sensibilidad y especificidad.

Para la detección de microfilarias se debe realizar una extracción de sangre nocturna, a la que se somete a un procedimiento de concentración (filtrado o lisis-centrifugación), identificándose las microfilarias por su morfología tras teñirlas con Giemsa (ver detalles en el PNT-PI-05 de este procedimiento). La ausencia de microfilaremia no descarta la parasitación.

La detección de anticuerpos puede resultar útil en expatriados a zonas endémicas sin microfilaremia detectable. La presencia de IgG4 específica se considera un marcador sensible de infección activa.

La detección de antígenos circulantes de filarias es probablemente el método diagnóstico más fiable para la detección de *Wuchereria* spp. y no necesita toma de muestra nocturna (ver Procedimiento nº 19, SEIMC 2005, PNT-TDA-5, págs. 3-4 y 6). Las cantidades de antígeno Og4C3 se correlacionan con la intensidad de la parasitación y se hace indetectable al año de realizar un tratamiento curativo.

El tratamiento de elección es objeto de controversia. Actualmente se usan distintas pautas y combinaciones de dietil carmabazina, ivermectina, albendazol y doxiciclina. La elección puede variar según se trate de un caso individual que va a ser reevaluado periódicamente o de tratamientos en masa en zonas endémicas y de la presencia de otras parasitosis concomitantes, especialmente *Loa loa*, *Onchocerca volvulus* y *S. stercoralis*.

4.6.2. Diagnóstico de la oncocerquiasis. La oncocerquiasis también llamada oncocercosis, ceguera de los ríos, craw-craw (África), enfermedad de Robles, erisipela de la costa y mal morado (Hispanoamérica) es una enfermedad crónica producida por *Onchocerca volvulus*, que se encuentra muy extendida en África y es endémica en Yemen. En Iberoamérica sólo persisten 13 pequeños focos en regresión en Brasil, Colombia, Ecuador, Guatemala, México y Venezuela (Figuras 7 y 8).

El parásito se transmite por un simúlido de hábitos diurnos (mosca negra) que se reproduce en aguas corrientes bien aireadas (de lo que deriva la asociación de esta enfermedad con los ríos). Las larvas inoculadas por la picadura se transforman en adultos que miden unos 3-5 cm. los machos y 30-80 cm. las hembras y se localizan en el tejido subcutáneo enredados formando ovillos. Estos nódulos subcutáneos suelen localizarse cerca de prominencias óseas y no suelen producir molestias

clínicas. A la exploración física son similares a los que aparecen en la cisticercosis, con la que coexisten en algunas regiones y que debe considerarse en el diagnóstico diferencial. A los 3-8 meses de la infección se puede detectar la presencia de microfilarias. Los síntomas pueden tardar en aparecer meses o años y sólo se manifiestan en individuos que han sufrido múltiples picaduras infectivas.

Las microfilarias invaden la piel y la córnea. Actualmente se considera que el papel principal en la patogenia de la enfermedad lo desempeñan las microfilarias y en menor medida las endotoxinas de bacterias del género *Wolbachia* que albergan. La afectación ocular inicial suele ser una queratitis punctata con opacificación progresiva de la misma y, en ocasiones complicada con uveítis anterior, glaucoma, corioretinitis o neuritis óptica. La infiltración de la piel por las microfilarias puede ser asintomática o producir distintas formas de dermatitis generalmente pruriginosas y acompañadas de hiper o hipopigmentación (dermatitis papular, dermatitis liquenoide o sowda, dermatitis atrófica o piel de leopardo, etc.).

El diagnóstico de laboratorio de la parasitación puede realizarse mediante la visualización de las microfilarias en piel o en la cámara ocular anterior, el

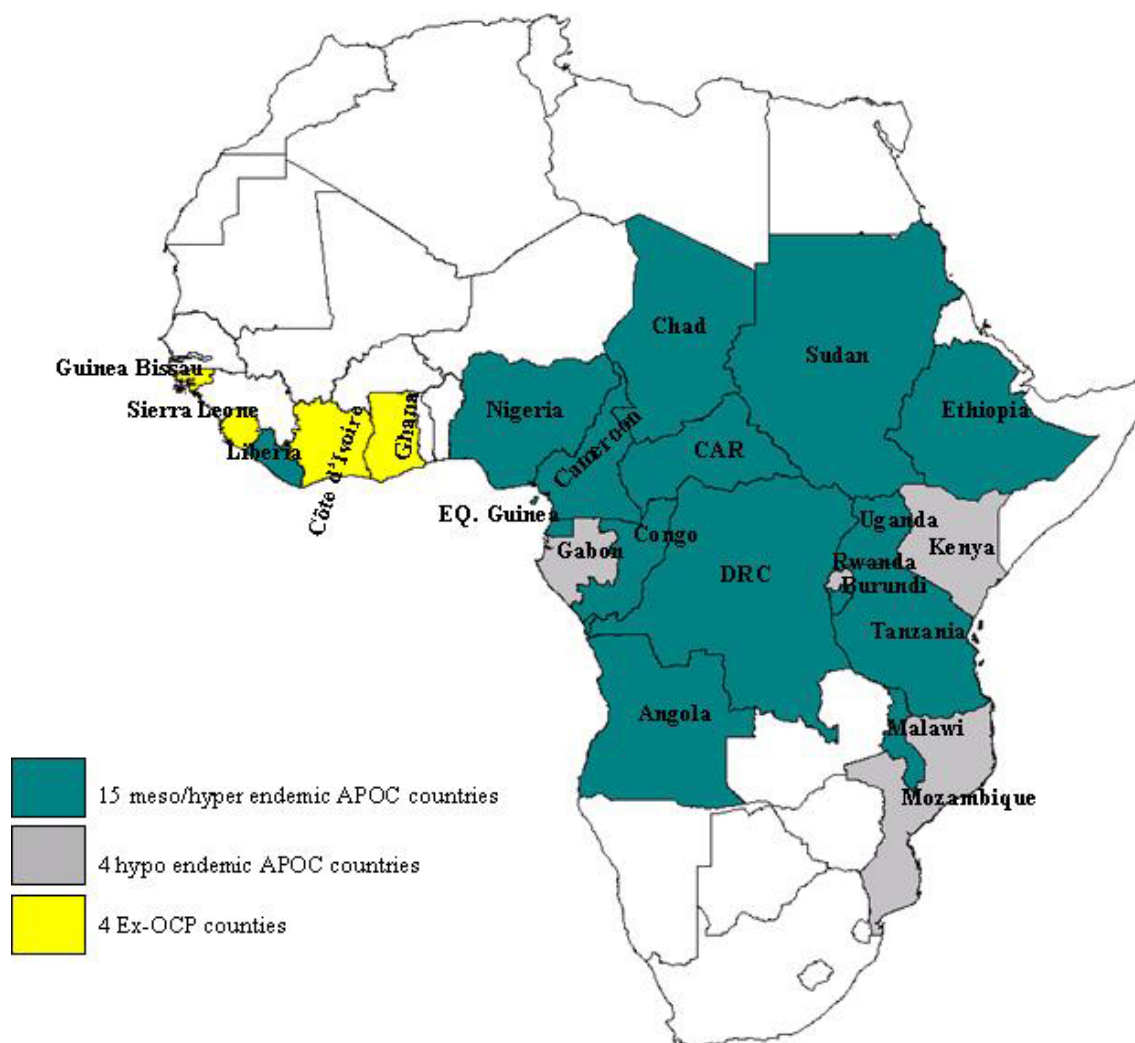
examen de los oncocercomas extirpados, la respuesta clínica a la dietil carbamazina, la detección de anticuerpos o de antígenos en suero y técnicas de PCR. En el diagnóstico diferencial se deben incluir cuadros alérgicos, treponematosis endémicas, sífilis, lepra y déficit de vitamina A.

Pellizco cutáneo. Se descontaminan con alcohol al 70% las zonas a muestrear. Se introduce la punta de una aguja hipodérmica en la dermis, se levanta la piel y con una hoja de bisturí se secciona un fragmento de piel prácticamente exangüe. El fragmento se introduce en un tubo con unas gotas de suero salino fisiológico que se incuba a 37°C y se examina con un objetivo de bajo aumento o una lupa binocular como mínimo a las 2 y a las 24 horas de realizar la toma. Pasado ese tiempo es aconsejable centrifugar el líquido y realizar una tinción de Giemsa del sedimento (sin los fragmentos de piel) para comprobar la ausencia de filarias o, si las hubiera, sus detalles anatómicos. Para diferenciarla de *Mansonella streptocerca* o de filarias presentes en sangre. Lo habitual es tomar una muestra de piel de la zona escapular, cresta ilíaca y región gemelar (todas de los lados derecho e izquierdo (un total de 6 fragmentos de piel).

Figura 7. Focos activos de oncocerquiasis en América. Tomado de: *Onchocerciasis Elimination Program for the Americas* (<http://www.oepa.net/epidemiologia.html>)



Figura 8. Focos activos de oncocerquiasis en África. En amarillo: países que habiendo sido incluidos en el *Onchocerciasis Control Program in West Africa* (OCP) todavía presentaban transmisión cuando finalizó el este programa en el 2002.



El procedimiento es menos doloroso si se realiza con habilidad y suele realizarse sin anestesia. La muestra de dermis también puede tomarse con un *punch* de Holth, diseñado para hacer biopsias esclerocorneales. La rentabilidad diagnóstica de este procedimiento depende de la intensidad de la infestación. Es baja durante los primeros uno o dos años de parasitación, en expatriados y en la forma liquenoide.

Examen de polo anterior. Utilizando un oftalmoscopio o una lámpara de hendidura puede examinarse la córnea para detectar una queratitis punctata o la cámara anterior en busca de microfilarias. Conviene recordar que las microfilarias de *Onchocerca* spp. miden de 0,2 a 0,3 mm y que la filaria que ocasionalmente se ve pasar por debajo de la conjuntiva del globo ocular es la macrofilaria de *Loa loa*.

Test de Mazzoti. Consiste en administrar una dosis de 50 mg. de dietil carbamazina y comprobar si aparece un intenso prurito en las 3 a 24 horas siguientes. Esta respuesta resulta molesta para el paciente y potencialmente grave cuando la parasitación es intensa.

Parche de dietil carbamazina. La respuesta local a la dietil carbamacina absorbida a través de la piel es una alternativa diagnóstica interesante. Se basa en la reproducción de una pequeña reacción de Mazzoti localizada. El procedimiento consiste en aplicar una cantidad de 0,55 ml de leche Nivea a la que se ha añadido un 20% de dietil carbamazina en un papel de filtro de 2x3 cm., aplicarlo sobre la piel de la espalda o de la cresta ilíaca, y cubrirlo con un apósito. Dos días después se quita el parche y la presencia de signos inflamatorios o prurito en esa zona es indicativo de filariasis. El test puede ser positivo en casos de oncocerquiasis y de loasis y se ha desarrollado para evaluar tasas de prevalencia en zonas endémicas más que para el diagnóstico individual. Los datos publicados de sensibilidad y especificidad son muy dispares, no existe un test de certeza que sirva como patrón oro con el que comparar. La reactividad varía en función de la edad y de los antecedentes de tratamiento con dietil carbamacina (DEC).

Otros métodos. Existen múltiples métodos diagnósticos desarrollados que no han llegado a comercializarse. Los basados en la detección de

anticuerpos son útiles en estudios de prevalencia y el empleo de antígenos recombinantes aumenta su especificidad. La presencia del parásito puede detectarse mediante PCR de las biopsias o del raspado cutáneo con mayor sensibilidad que con las técnicas basadas en el examen microscópico. La detección de antígenos de *Onchocerca* spp. es probablemente uno de los mejores métodos en cuanto a sensibilidad, especificidad y aceptabilidad a un coste razonable.

4.6.3. Diagnóstico de la loasis. La *Loa loa* es una filaria endémica del oeste y el centro del África subsahariana. Se transmite por un tábano de hábitos diurnos perteneciente al género *Chrysops*. Tras la picadura, la larva inoculada madura a lo largo de tres meses transformándose en adulto de 3 a 7 cm. de longitud. Los adultos migran por el tejido subcutáneo y, ocasionalmente entre la conjuntiva del globo ocular y la esclera. A partir de los 6-12 meses y durante varios años, los adultos producen miles de microfilarias que pasan a la sangre. La microfilaremia es más alta en las horas centrales del día que por la noche. Estas filarias no albergan bacterias del género *Wolbachia*. La mayor parte de estas parasitaciones son asintomáticas. Los síntomas son más frecuentes en expatriados que en los nativos de zonas endémicas y frecuentemente tienen menor carga de filarias y más frecuentemente hipereosinofilia. Las manifestaciones clínicas más frecuentes son los edemas localizados que aparecen al paso del gusano adulto (edemas de Calabar). Ocasionalmente aparece prurito, urticaria o asma. Se ha relacionado esta parasitación con la fibrosis endomiocárdica.

El diagnóstico de laboratorio se basa en la detección de filarias circulantes en sangre diurna empleando los métodos descritos para las filarias linfáticas. La detección de anticuerpos específicos del tipo IgG4 puede reforzar la sospecha diagnóstica en pacientes sin microfilaremia detectable.

4.6.4. Diagnóstico de la parasitación por *Mansonella* spp. Las filarias del género *Mansonella* se consideran menos importantes desde el punto de vista clínico aunque afectan a un importante volumen de población. La sintomatología que se les atribuye queda desdibujada por la frecuente coexistencia de otras helmintiasis incluidas otras filarias. Son una importante causa de reacciones serológicas cruzadas y se deben tener en cuenta en el diagnóstico diferencial microscópico de filarias detectadas en muestras clínicas.

Las tres especies de *Mansonella* que parasitan al humano son *M. ozzardi*, *M. perstans* y *M. streptocerca*.

4.6.5. Diagnóstico de filariasis autóctonas de Europa (dirofilariasis). *Dirofilaria immitis* y

Dirofilaria repens, son unas filarias de distribución universal que afectan frecuentemente a perros y gatos y, excepcionalmente, a humanos existiendo unos centenares de casos publicados.

Su presentación clínica en humanos es del tipo de larva migrans visceral o de pseudotumoración. En ocasiones se detecta en el examen histológico de un nódulo pulmonar, periocular, escrotal, mamario, subcutáneo o más raramente en otras localizaciones. Como el humano es un hospedador paraténico, la filaria adulta acaba muriendo sin llegar a producir microfilarias por lo que el diagnóstico es clínico y serológico o bien un hallazgo histológico en una masa extirpada. Existen técnicas de PCR que permiten la identificación precisa del parásito a partir de tejido parasitado. No existen métodos diagnósticos comercializados siendo aconsejable contactar con grupos de investigación expertos en diagnóstico de esta filariasis.

4.7. DIAGNÓSTICO DE LA ESQUISTOSOMIASIS

4.7.1. Consideraciones generales. La esquistosomiasis es una enfermedad crónica que afecta a unos 200 millones de personas de los cuales algo más de la mitad están sintomáticos. El parásito es 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. Hay cinco especies de *Schistosoma* que parasitan al humano. La esquistosomiasis intestinal la producen *Schistosoma mansoni*, *S. intercalatum*, *S. japonicum* y *S. mekongi*. Los parásitos adultos se emparejan y 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 siendo especialmente graves las localizaciones medulares (*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 antes mencionadas o también por parásitos de aves, generalmente del género *Trichobilharzia* de distribución cosmopolita. En la Figura 9 se indican los países del mundo en los que existen zonas de riesgo para la esquistosomiasis.

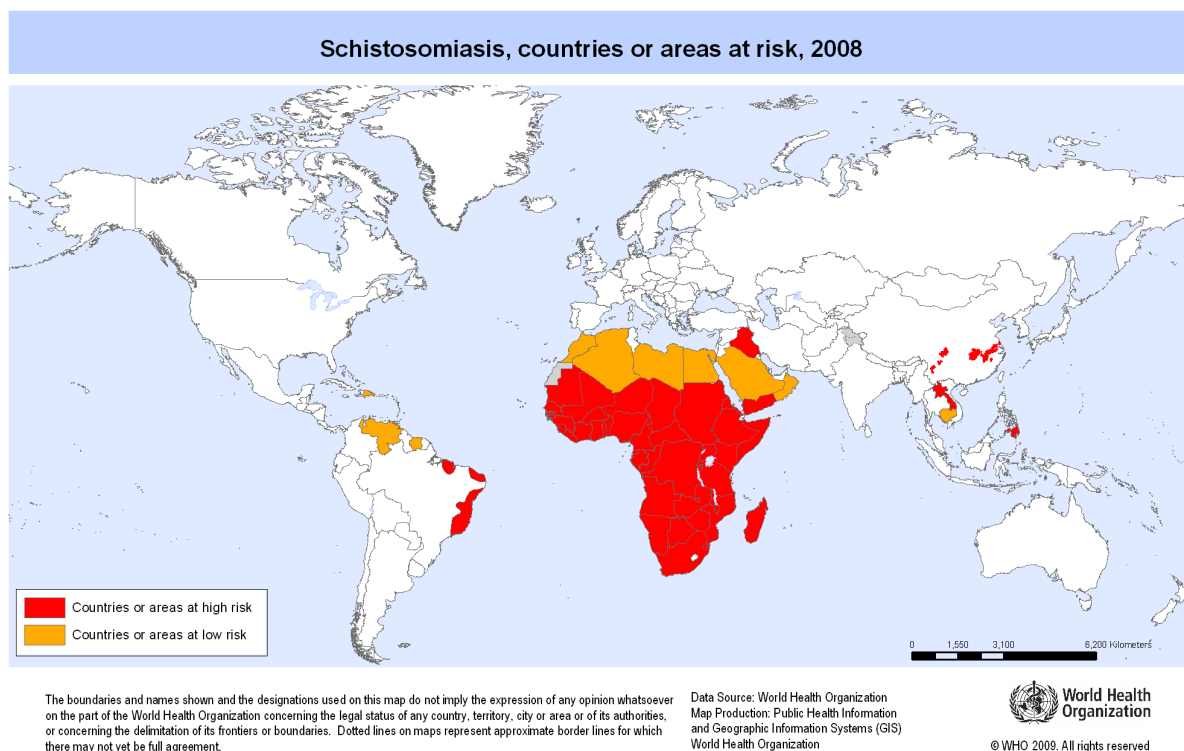


Figura 9. Países con zonas de riesgo de esquistosomiasis. (Tomado de WHO 2009).

4.7.2. Diagnóstico de laboratorio de la esquistosomiasis urinaria. La orina recogida según se indica en el apartado 3.9. de este procedimiento, se procesa por centrifugación o por filtración.

Se puede centrifugar toda la orina o bien dejarla sedimentar espontáneamente en su recipiente durante al menos una hora, tirar la parte superior del sobrenadante y el resto agitarlo y pasarlo a unos tubos de centrifuga. La centrifugación debe hacerse a 2000 xg durante 2 minutos. Se debe examinar la totalidad del sedimento en busca de huevos de *S. haematobium*. Si hay muchas sales precipitadas pueden redisolverse añadiendo inmediatamente antes del examen microscópico unas gotas de ácido clorhídrico 1N o de hidróxido sódico 1N según se trate de fosfatos o uratos, respectivamente.

Como procedimiento alternativo puede tomarse la orina con una jeringa y pasarse por un filtro de policarbonato o de nailon (poro de 12 a 20 micras) colocado en un dispositivo contenedor del filtro que se cierra a rosca. Tras pasar la orina por el filtro se inyecta un poco de aire para expulsar el resto de orina, se abre el dispositivo, se saca el filtro y se coloca en un portaobjetos con la cara superior (donde se quedan los huevos) hacia arriba. Se añade una gota de lugol, un cubreobjetos y se observa al microscopio.

El diagnóstico serológico mediante ELISA es el método más sensible para detectar infección por cualquiera de las especies del género *Schistosoma* pero los títulos pueden persistir positivos muchos meses después de un tratamiento eficaz.

4.7.3. Diagnóstico de laboratorio de la esquistosomiasis intestinal. El estudio de las

heces puede realizarse por el método de rutina de concentración bifásica. El método de Kato-Katz es un sistema de evaluación microscópica que permite cuantificar la carga de huevos y es muy utilizado en trabajos de campo. Para realizarlo se filtran las heces a través de una fina malla de alambre; sobre un portaobjetos se coloca una cartulina con un pocillo central donde se depositan las heces filtradas, se retira la cartulina y se cubre con un papel de celofán empapado en una solución acuosa de glicerina y verde malaquita o azul de metileno, se aplanan al máximo la muestra y se deja la preparación bajo una fuente de calor suave durante 20-30 minutos hasta su aclaración, posteriormente se observa al microscopio barriendo toda la preparación con el objetivo de 10x.

En ocasiones en las que no se encuentren parásitos en heces el examen en fresco de una biopsia de mucosa rectal puede resultar diagnóstico.

Pruebas de viabilidad de los huevos de *Schistosoma* spp. Cuando se detecten huevos de *Schistosoma* spp. en una muestra éstos deben ser examinados cuidadosamente para determinar su viabilidad. Después de un tratamiento eficaz se pueden eliminar huevos no viables durante semanas o meses. La presencia de miracidios vivos dentro de los huevos indica una infección activa que debe ser tratada. Es imprescindible que la orina o las heces sean frescas, sin conservantes y sin refrigerar. La viabilidad del miracidio dentro del huevo puede determinarse de dos formas:

- Se puede observar al microscopio el movimiento de los cilios de las células excretorias primitivas, también llamadas células

flamígeras o “en llama”, localizadas a los lados del miracidio, llamadas así porque tienen un movimiento semejante al de la llama de una vela.

- Se puede comprobar si los huevos eclosionan al contacto con el agua. Para ello se mezclan las heces con suero salino, se filtran y se dejan sedimentar. Se repite el proceso una segunda vez. El sedimento de las heces o la orina se mezcla con agua destilada y se coloca en un frasco tipo Erlenmeyer. Se tapa el frasco dejando la boca expuesta a la luz y se deja a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Cuando se coloca una luz intensa sobre el costado del frasco, los miracidios presentes, si están viables, nadarán hacia la luz y se pueden observar con una lupa potente.

4.8. ARTRÓPODOS TROPICALES QUE PARASITAN HUMANOS

Independientemente de la importancia de los artrópodos como vectores de enfermedades infecciosas y de la patogenicidad de sus ponzoñas hay tres artrópodos importantes, de distribución tropical, capaces de parasitar temporalmente al humano: Las larvas productoras de miasis forunculares (*Dermatobia hominis* y *Cordylobia anthropophaga*), una pulga (*Tunga penetrans*) y dos grupos de organismos de clasificación incierta, a medio camino entre los artrópodos y los moluscos: los pentastomas (principalmente *Linguatula* spp. y *Armillifer* spp.).

4.8.1. Miasis. Se denominan miasis a las parasitaciones por larvas de moscas.

4.8.1.1. Miasis foruncular americana: *Dermatobia hominis*. Se conoce comúnmente como colmoyote, moyocuil (Méjico), torsalo, nunche (Centroamérica, Colombia y Venezuela), berna (Brasil), sututo, mirunta (Perú), ura (Argentina, Paraguay y Uruguay) gusanos macacos o gusanos de cayena (Guayana), lo que da información sobre su área de distribución. La mosca adulta de *Dermatobia* spp. captura un mosquito u otro artrópodo y adhiere sus huevos al abdomen del mismo. Cuando el mosquito pica los huevos, éstos eclosionan y las larvas se introducen bajo la piel dejando un orificio al exterior por donde respiran exteriorizando periódicamente los estigmas respiratorios de su polo caudal a través del orificio. Si se deja evolucionar 6-12 semanas, la larva emerge y cae al suelo para pupar. El paciente suele referir dolor y sensación de movimientos en la lesión. El diagnóstico clínico se basa en la presencia de una lesión de aspecto foruncular por cuyo orificio central asoma el extremo caudal, detectable a simple vista, que se retrae al menor contacto. Por regla general una larva ocupa un único orificio y en las parasitaciones múltiples las larvas no ocupan zonas contiguas de piel.

Para su extracción se sofoca a la larva aplicando una gruesa capa de crema o pomada (por ejemplo vaselina o pomada de ácido fusídico) sobre el orificio foruncular y se captura la larva con unas pinzas cuando se asoma para respirar. Debe evitarse fragmentar la larva para facilitar la curación del

granuloma periparasitario y evitar infecciones secundarias. Cuando esto falla (lo que no es raro en fases avanzadas de la parasitación) puede extraerse quirúrgicamente. La inyección de anestésico local en ocasiones se sigue de la exteriorización inmediata de la larva. Si no es así se procede realizando un corte superficial con un bisturí en el orificio central del forúnculo parasitario y posteriormente se alcanza la cámara subcutánea donde se encuentra la larva ampliando cuidadosamente el trayecto mediante disección roma con unas pinzas tipo mosquito. No es necesaria la extirpación en bloque del nódulo que termina desapareciendo en unos meses. Un método alternativo que no requiere instrumental alguno consiste en colocar un trozo de panceta, de tocino o de carne cruda sobre la lesión y esperar unas horas a que la larva migre al nuevo “tejido”.

Tanto en esta como en las otras miasis importadas deben tomarse precauciones para destruir los organismos viables evitando así la introducción en la zona de un patógeno de graves consecuencias para humanos y otros mamíferos.

El diagnóstico diferencial debe realizarse con las parasitaciones por otras larvas en función de las características clínicas y epidemiológicas del cuadro y las anatómicas de la larva. Las principales características diferenciales se refieren a la forma de los estigmas respiratorios, la cutícula y el aparato bucal. Para remitir el espécimen a un centro de referencia se aconseja introducirlo en agua hirviendo y pasarlo luego a un tubo de cierre hermético con agua formolada al 10%.

4.8.1.2. Miasis foruncular africana: *Cordylobia* spp. La miasis foruncular en África y Arabia la causa *Cordylobia anthropophaga* o mosca tumbú y *Cordylobia rodhaini* o mosca de Lund. La hembra pone los huevos en la arena, la hierba o en la ropa dejada a secar, en donde puede permanecer viable hasta 2 semanas. Al contacto con la piel las larvas penetran produciendo unas lesiones similares a las de *Dermatobia*. Tras una o dos semanas de parasitación, la larva abandona al hospedador y cae al suelo donde se transforma en pupa y luego en mosca. El manejo terapéutico es el mismo que para *Dermatobia*.

4.8.1.3. Otras miasis. Las moscas de la carne, de distribución universal, tales como *Lucilia* spp., *Calliphora* spp., *Sarcophaga* spp., etc., pueden depositar sus huevos en lesiones ulceradas (habitualmente tumores cutáneos, úlceras de decúbito o úlceras varicosas) o en cavidades expuestas (boca, vagina ...) y desarrollarse localmente. Los pacientes suelen tener algún tipo de déficit neurológico o cognitivo que limita su capacidad de ahuyentar las moscas. Para la identificación genérica pueden examinarse con una lupa potente los estigmas respiratorios. Si las larvas se recogen sin dañar y se depositan sobre un trozo de carne cruda o un coágulo de sangre se puede observar el desarrollo de la pupa y la mosca adulta. Su eliminación se puede realizar mediante el sofocamiento con una crema y retirada con pinzas. En lesiones muy anfractuosas la salida de las larvas

se ha inducido derramando éter etílico con una jeringa, procedimiento que entraña un cierto riesgo de toxicidad y fuego o explosión.

Cochliomyia hominivorax es una mosca de Iberoamérica que deposita los huevos en heridas a partir de las cuales las larvas se desplazan excavando túneles subcutáneos y alimentándose de tejido vivo (gusano barrenador). *Chrysomya bezziana* es su equivalente en zonas tropicales del viejo mundo, siendo especialmente prevalente en Asia.

Otras larvas de mosca autóctonas, que ocasionalmente afectan a los humanos son *Oestrus ovis* que causa miasis conjuntival y excepcionalmente nasal o sinusal, e *Hypoderma* spp. causante de cuadros de hipereosinofilia y poliseritis hasta su exteriorización

4.8.2. Tunguiasis. La *Tunga penetrans* es una pulga endémica de algunas zonas del África Subsahariana e Iberoamérica. En Sudamérica recibe el nombre de nigua (nombre que también se aplica a los ácaros de la familia *Trombiculidae*) o pulga de arena. La hembra atraviesa la piel del hospedador, generalmente en las zonas subungueales o laterales de los pies, aunque puede afectar otras zonas cutáneas. Tras penetrar la dermis, el abdomen de la pulga se dilata enormemente cargado de huevos, pudiendo alcanzar un diámetro de hasta 1 cm. en pocos días. Las manifestaciones clínicas son fundamentalmente de dolor con sensación de cuerpo extraño en las zonas donde se han instalado la pulga donde se puede observar el punto de entrada pero no suele ser posible reconocer la porción de pulga que queda expuesta fuera de la epidermis. Su tratamiento consiste en la expresión de la lesión o su apertura quirúrgica produciéndose la salida de numerosos huevos blancos característicos de esta parasitación. Se deben eliminar todos los restos parasitarios de la lesión y aplicar antisépticos tópicos. En parasitaciones masivas o con lesiones sobreinfectadas deben administrarse antibióticos. El uso de calzado cerrado reduce las posibilidades de parasitación

4.8.3. Pentastomiasis. Son zoonosis parasitarias poco frecuentes en humanos. Se han descrito casos en humanos producidos por los géneros *Linguatula* y *Armillifer*, y, excepcionalmente por *Leiperia* spp., *Porocephalus* spp. y *Raillietiella* spp.

Linguatula serrata es un porocefálico de distribución global. La parasitación por este organismo es conocida con el nombre de halzoun en Líbano y marrara en Sudán. Se caracteriza por un cuadro agudo de dolor, tos, estornudos, rinorrea sanguinolenta, parálisis facial, afectación óptica u ocular que se produce por migración de los parásitos horas después de consumir alimentos conteniendo vísceras de cabra, oveja o camello crudos. La mayor parte de los casos se han descrito en el Próximo Oriente y en Oriente Medio. El diagnóstico de laboratorio se basa en el examen anatómico del organismo.

Armillifer armillatus es parásito de ofidios y diversos mamíferos actúan como hospedador intermediario. La parasitación humana en África se

produce al consumir carne de serpiente poco cocinada (habitualmente pitón ahumada), y agua o alimentos crudos contaminados con heces de ofidio. Tras ser ingerido el parásito sufre varias mudas, se desplaza por las serosas y puede enquistarse en la pared abdominal, el pulmón u otros órganos donde termina calcificándose. Los síntomas de la fase aguda a menudo pasan sin diagnóstico y se han descrito molestias abdominales relacionadas con la migración o problemas de ocupación de espacio en la fase quística. A menudo constituye un hallazgo en una exploración quirúrgica, radiológica o necrópsica.

5. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP *et al.* The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the Second 10 Years. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21:334-359.
- 2.- Baliraine FN, Afrane YA, Amenya DA, Bonizzoni M, Menge DM, Zhou G, Zhong D, Vardo-Zalik AM, Githeko AK, Yan G. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections in a highland area of western Kenya: a cohort study. *J Infect Dis* 2009; 200:66-74.
- 3.- Boatin BA, Toé L, Alley ES, Nagelkerke NJ, Borsboom G, Habbema JD. Detection of *Onchocerca volvulus* infection in low prevalence areas: a comparison of three diagnostic methods. *Parasitology* 2002; 125:545-552.
- 4.- 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.
- 5.- Carlier Y, Torrico F. Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36:767-771.
- 6.- Castro E. Transfusión sanguínea y enfermedad de Chagas: iniciativas en Centros de Transfusión de España. *Enf Emerg* 2006; 8 (Supl 1):48-50.
- 7.- Chappuis F, Loutan L, Simarro P, Lejon V, Büscher P. Options for field diagnosis of human african trypanosomiasis. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:133-146.
- 8.- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 2007; 5:873-882.
- 9.- Coronado X, Zulantay I, Reyes E, Apt W, Venegas J, Rodríguez J, *et al.* Comparison of *Trypanosoma cruzi* detection by PCR in blood and dejections of *Triatoma infestans* fed on patients with chronic Chagas disease. *Acta Trop*. 2006; 98:314-317.
- 10.- Craig P, Ito A. Intestinal cestodes. *Curr Opin Infect Dis* 2007; 20: 524-532.
- 11.- Cuadros J, Martín-Rabadán P, Merino FJ, Delgado-Iribarren A, García-Bujalance S, Rubio JM. Malaria diagnosis by NOW ICT and expert microscopy in comparison with multiplex polymerase chain reaction in febrile returned travellers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26:671-673.
- 12.- Deborggraeve S, Laurent T, Espinosa D, Van der Auwera G, Mbuchi M, Wasunna M *et al.* A simplified and standardized polymerase chain reaction format for the diagnosis of leishmaniasis. *J Infect Dis* 2008; 198:1565-1572.
- 13.-- Diagnostic methods in malaria. Gilles HM. In "Essential Malariology" 4 th ed. David A. Warrell and Herbert M. Gilles. Oxford University Press, 2002.

- 14.- Flores-Chávez M, de Fuentes I, Gárate T, Cañavate C. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas importada. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25 (Supl 3):29-37.
 - 15.- Fotedar R, Stara D, Beebe N, Marrito D, Ellis J, Harkness J. Laboratory Diagnostic Techniques for *Entamoeba* Species. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:511-532.
 - 16.- Freilij H, Muller L, González Cappa SM. Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease. *J Clin Microbiol.* 1983; 18:327-330.
 - 17.- Katabarwa M, Lakwo T, Habumogisha P, Richards F, Eberhard M. Could neurocysticercosis be the cause of "onchocerciasis-associated" epileptic seizures?. *Am J Trop Med Hyg* 2008;78:400-401.
 - 18.- Louffy MR, Wilson M, Keystone JS, Kain KC. Serology and eosinophil count in the diagnosis and management of strongyloidiasis in a non-endemic area. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66:749-752.
 - 19.- McCarthy JS, Guinea A, Weil GJ, Ottesen EA. Clearance of circulating filarial antigen as a measure of the macrofilaricidal activity of diethylcarbamazine in *Wuchereria bancrofti* infection. *J Infect Dis* 1995; 172:521-526.
 - 20.- Murray CK, Gasser RA Jr, Magill AJ, Miller RS. Update on rapid diagnostic testing for malaria. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21:97-110.
 - 21.- OMS. Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Grupo de trabajo científico 17-20 de abril de 2005. Actualizado en julio de 2007. Guhl F, Lazdins-Helds J, editors. http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/swg_chagas.pdf, 1-96. 2007. Buenos Aires-Argentina.
 - 22.- Ozoh G, Boussinesq M, Bissek AC, Kobangue L, Kombila M, Mbina JR, Enyong P, Noma M, Sékétéli A, Fobi G. Evaluation of the diethylcarbamazine patch to evaluate onchocerciasis endemicity in Central Africa. *Trop Med Int Health.* 2007; 12:123-129.
 - 23.- Pampiglione S, Rivasi F, Gustinelli A. Dirofilarial human cases in the Old World, attributed to *Dirofilaria immitis*: a critical analysis. *Histopathology.* 2009; 54:192-204.
 - 24.- Pardo J, Pérez-Arellano JI, Galindo I, Belhassen M, Cordero M, Muro A. Diagnóstico de helmintiasis importadas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007;25:329-335.
 - 25.- Paricio-Talayero JM, Benlloch-Muncharaz MJ, Collar-del-Castillo JI, Rubio-Soriano A, Serrat-Pérez C, Magraner-Egea J *et al.* Vigilancia epidemiológica de la transmisión vertical de la enfermedad de Chagas en tres maternidades de la Comunidad Valenciana. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; 26:609-613.
 - 26.- Pintado V, Martín-Rabadán P, Rivera ML, Moreno S, Bouza E. Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients. A comparative study. *Medicine (Baltimore).* 2001; 80:54-73.
 - 27.- Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M *et al.* Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop.* 2007; 103:195-200.
 - 28.- Pritt BS, Clark CG. Amebiasis. *Mayo Clinic Proc* 2008;83:1154-1160.
 - 29.- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7: 581-595.
 - 30.- Riera C, Fisa R, Lopez R, Ribera E, Carrió J, Falcó V *et al.* Evaluation of a latex agglutination test (KAtex) for detection of *Leishmania* antigen in urine of patients with HIV-*Leishmania* coinfection: value in diagnosis and post-treatment follow-up. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23:899-904.
 - 31.- Riera C, Fisa R, López-Chejade P, Serra T, Girona E, Jiménez M, Muncunill J, Sedeño M, Mascaró M, Udina M, Gállego M, Carrió J, Forteza A, Portús M. Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). *Transfusion.* 2008; 48:1383-1389.
 - 32.- Siddiqui AA, Berk L. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* Infection. *Clin Infect Dis* 2001;33:1040-1047.
 - 33.- Sosa-Estani S. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005; 38 (Suppl 2):29-32.
 - 34.- Stich A, Abel PM, Krishna S. Human African trypanosomiasis. *British Med J.* 2002; 325:203-206.
 - 35.- Udall DN. Recent updates on onchocerciasis: diagnosis and treatment. *Clin Infect Dis* 2007; 44:53-60.
 - 36.- Van Doorn HR, Koelewijn R, Hofwegen H, Gilis H, Wetsteyn JCFM, Wismans PJ, Safati C, Vervoort T, van Gool T. Use of enzyme-linked immunosorbent assay and dipstick assay for detection of *Strongyloides stercoralis* infection in humans. *J Clin Microbiol* 2007;45:438-442.
 - 37.- Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sutamihardja A, Wernsdorfer WH. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 77(6 Suppl):119-127.
- Textos generales :**
- García LS. Practical guide to diagnostic parasitology. 1999, ASM Press.
 - García LS. Diagnostic Medical Parasitology. 5th edition 2007, ASM Press.
 - Métodos básicos de laboratorio en parasitología médica 1991. Organización Mundial de la Salud: [http://whqlibdoc.who.int/publications/9243544101_\(part1\).pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/9243544101_(part1).pdf)
 - [http://whqlibdoc.who.int/publications/9243544101_\(part2\).pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/9243544101_(part2).pdf)
 - Training Manual on Diagnosis of Intestinal Parasites. World Health Organization 1998. Disponible en: http://www.who.int/wormcontrol/documents/benchaid/training_manual/en/
http://www.who.int/wormcontrol/documents/benchaid/en/trainingmanual_sip98-2.pdf
 - López-Vélez R, Martín Echavarría E, Pérez Molina JA. Guía de enfermedades infecciosas importadas. Ministerio de Sanidad y Consumo, Centro de Publicaciones. Madrid, 2008. Disponible en <http://www.060.es>
- Iconografía y atlas en red:**
- CDC: DPDx: http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Image_Library.htm
 - OMS: http://www.who.int/wormcontrol/documents/benchaid/training_manual/en/#
 - The Public Health Image Library. (Contiene miles de imágenes y vídeos de alta calidad para uso público de forma gratuita) <http://phil.cdc.gov/phil>
 - Atlas of medical parasitology. Fundación Carlo Denegri, Clínica de Enfermedades Infecciosas de la Universidad de Turín y Hospital Amadeo de Saboya. (Atlas parasitológico virtual): http://www.cdfound.to.it/_atlas.htm
 - Imágenes y casos clínicos: <http://www.med-chem.com>
 - Universidad de Delaware: <http://www.udel.edu/medtech/dlehman/medt372/index.html>
 - Imágenes de parásitos y pacientes: <http://curezone.com/ig/f.asp?f=16>
 - Universidad de Cincinnati : http://biology.clc.uc.edu/fankhauser/Labs/Microbiology/Prepared_Slides/Micro_Protozoans.htm.

PNT-PI-01
EXÁMEN MICROSCÓPICO DE SANGRE PARA DETECCIÓN DE MALARIA

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

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº..... ASIGNADA A

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital..... 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 de Microbiología Hospital.....	Exámen microscópico de sangre para detección de malaria	PNT-PI-01	
		Edición N° 01	Página 2 de 9

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir el método de tinción de *Plasmodium* spp. en sangre periférica mediante la tinción de Giemsa (que también se emplea para visualización de otros parásitos hemáticos y tisulares). Es un documento de consulta para el personal del laboratorio encargado de su realización e interpretación.

2. FUNDAMENTO

Plasmodium spp. son unos protozoos que parasitan los hematíes, por lo que el diagnóstico se realiza observando su presencia en muestras teñidas de sangre periférica.

El colorante de Giemsa es una mezcla de pigmentos que tiñe de forma diferenciable algunos orgánulos parasitarios (citoplasma azulado, cromatina rojiza) y las células hemáticas. La realización de la tinción de Giemsa permite reconocer e identificar la presencia de *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi*, *Babesia* spp., *Trypanosoma cruzi*, *T. rangelli*, *T. brucei*, *Toxoplasma* spp. y filarias.

Para el diagnóstico de malaria la tinción se realiza habitualmente en muestras de sangre periférica, aunque también puede hacerse con sangre capilar, tejido placentario, médula ósea o tejido esplénico, ante la sospecha clínico-epidemiológica de malaria.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Loza E (Coordinador). Alomar P, Bernal A, Harto A, Pérez JL, Picazo JJ, Sarazá LL. Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica. Procedimientos en Microbiología nº 10, 1ª edición. SEIMC. 2000. Disponible en:

<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

- Atlas of medical parasitology. Fundación Carlo Denegri, Clínica de Enfermedades Infecciosas de la Universidad de Turín y Hospital Amadeo de Saboya. http://www.cdfound.to.it/_atlas.htm

4. MUESTRAS

Son muestras aceptables:

- Sangre anticoagulada con EDTA (tubo de Coulter, tapón morado) o heparina (tapón verde) o sangre capilar obtenida en el laboratorio mediante punción del pulpejo del dedo.

- Tejido de placenta, biopsia esplénica o médula ósea, extendidos en un porta o remitidos en frasco estéril con una pequeña cantidad de suero fisiológico o Ringer-lactato.

- El procesamiento debe realizarse lo antes posible, idealmente en los 30 primeros minutos desde la extracción de la muestra.

Se deben rechazar las muestras que se han dejado (a cualquier temperatura) durante un periodo superior a 8 horas desde su extracción. Si la microscopía no puede realizarse inmediatamente

deberán prepararse las gotas gruesas y extensiones para su tinción y/o examen microscópico posterior.

La muestra se recepcionará en el área destinada a tal fin en el laboratorio acompañada de la copia del volante de petición donde se comprobará qué entidad nosológica sospechada ha originado la petición y otros posibles datos epidemiológicos de interés diagnóstico. Toda sospecha de malaria o petición de gota gruesa se considerará urgente y se procesará como tal.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Reactivos y productos:

- Metanol grado técnico.
- Tampón fosfato pH 7,2
- Reactivo de Giemsa
- Placa excavada de cristal para aglutinaciones
- Agua destilada
- Aceite de inmersión

Conservación y fechas de caducidad:

Las fechas de caducidad no son o críticas para ninguno de los pasos de este procedimiento. Por tanto, podrán utilizarse los reactivos indicados 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 deberán estar limpios, no necesariamente estériles. Todos los materiales mencionados se conservan a temperatura ambiente.

6. APARATOS Y MATERIALES

Aparatos:

- Microscopio
- Placa calefactora

Material fungible:

- Guantes de látex
- 1 tubo graduado de 15 ml de polietileno
- Rotulador permanente
- Pipetas Pasteur (no estériles)
- Portaobjetos, cubreobjetos, líquido de montaje
- Cuaderno y lápiz para el registro

7. PROCESAMIENTO

1.- Ponerse guantes de látex.

2.- Separar las muestras recibidas en el laboratorio para tinción de Giemsa y alinearlas en la bancada por orden numérico. Comprobar los datos de la copia del volante de petición.

3.- Para obtener mejores resultados, las extensiones deben prepararse lo antes posible tras la llegada al laboratorio del tubo de sangre anticoagulada. De cada muestra se deben preparar y teñir al menos dos extensiones en capa fina y dos en gota gruesa. Adicionalmente, conviene dejar hechas (pero sin teñir) un par de extensiones y de gotas gruesas por si hubiera que repetir las tinciones.

Extensión fina:

1.- Para extender la sangre en capa fina se coloca con una pipeta Pasteur una cantidad aproximada de unos 5-10 µl de sangre en un extremo de un

Servicio de Microbiología Hospital.....	Exámen microscópico de sangre para detección de malaria	PNT-PI-01	
		Edición Nº 01	Página 2 de 9

portaobjetos identificado con el número correspondiente y se extiende con la arista de otro portaobjetos. La extensión se debe dejar secar completamente, y luego fijar en una cubeta de tinciones con metanol al 100% durante unos cinco minutos. Sacar de la cubeta y dejar que se evapore completamente el metanol.

2.- Preparar una dilución 1/10 del colorante de Giemsa comercial en el tampón fosfato (pH 7,2), al hacerlo se formará un precipitado. Colocar los portas invertidos sobre el envés de una placa de cristal excavada para aglutinación (con los pocillos hacia arriba, rellenos de colorante) para evitar que el precipitado artefactúe la extensión.

3.- Teñir exactamente durante 30 minutos con colorante Giemsa recién diluido. Eliminar los restos de colorante con agua destilada.

Gota gruesa:

1.- Para extender la gota gruesa se coloca con una pipeta Pasteur una cantidad aproximada de unos 50 µl de sangre (una gota) en el centro de un porta identificado con el número correspondiente y se extiende con la pipeta hasta dejar una extensión de sangre de un grosor tal que a través suyo se puedan leer los números de un reloj de pulsera (ver anexo I). La extensión se debe dejar secar completamente (no calentar ni fijar con metanol) y luego teñir con colorante Giemsa diluido 1/10 en tampón fosfato. Las gotas gruesas deben dejarse secar totalmente, por lo menos una hora en estufa a 37°C, y a continuación se tiñen con colorante Giemsa como se indica con las extensiones finas. Se deben extremar las precauciones para evitar que la sangre se desprenda del cristal. La sangre sobrante se dejará en la nevera por si se considerase necesario realizar PCR de *Plasmodium* spp. u otras técnicas.

Otras muestras:

Se realiza una extensión de la muestra y una vez seca se procederá como con la extensión fina.

1.- Dejar secar las extensiones (se puede usar la placa calefactora a baja temperatura o un ventilador), y montar con líquido de montaje (Permout) y un cubreobjetos largo.

2.- Las extensiones deben examinarse cuidadosamente en inmersión de aceite (objetivo 100X).

La gota gruesa se usa fundamentalmente para determinar la presencia o ausencia de *Plasmodium* spp., y las extensiones finas para determinar la especie o especies presentes en caso de positividad. En la gota gruesa deben examinarse como mínimo 200 campos con el objetivo de 100X antes de informarlas como negativas.

Si se observa la presencia de *Plasmodium* spp. debe calcularse la parasitemia según se indica en el anexo III al final de este texto.

Los resultados se anotarán en la hoja de trabajo y posteriormente en la hoja del libro de registro. Los negativos se anotarán como: "negativo" y en los

positivos se indicará el género y especie y estadio del parásito o parásitos visualizados.

Es conveniente archivar una de las extensiones y de las gotas gruesas teñidas, y cuando se haya supervisado el resultado definitivo por el responsable del área, se eliminarán el resto de los portaobjetos y de la sangre en un contenedor adecuado. Apagar, limpiar y cubrir el microscopio y limpiar toda la zona de trabajo.

Controles:

Controles externos: serán proporcionados por los diferentes programas de calidad a los que esté adscrito el laboratorio (por ejemplo, los de la asociación americana AAB). 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. Los resultados de los controles externos quedarán registrados en los libros de trabajo y en el ordenador central como cualquier otra muestra.

Controles internos: ocasionalmente se incluirán controles positivos que podrán ser realizados por el propio técnico que realiza el procedimiento o de forma ciega para dicho técnico y preparado por otra persona del servicio. Cada vez que se produzca un falso negativo en un control, este 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, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Los parásitos hemáticos o tisulares se identificarán visualmente, sobre la base de su tamaño, características tintoriales y morfología (ver figuras).

Si el resultado es positivo se indicará: Tinción de Giemsa: "se observa *Plasmodium* spp."

El resultado con los microorganismos identificados se introducirá en el sistema informático. Cuando el responsable del área lo considere necesario se podrá incluir un comentario aclaratorio en la especie correspondiente, siendo habitual incorporar el índice de parasitemia estimada.

Por ejemplo: "*Plasmodium falciparum*; índice de parasitemia: 4,5%".

Si el resultado es negativo se indicará: Tinción de Giemsa: "no se observan parásitos".

Todos los resultados positivos se comentarán de inmediato al responsable del área. Se informarán inmediata y telefónicamente los resultados con hallazgos significativos y previa consulta al encargado del área. En estos casos el volante se emitirá inmediatamente y si tiene otras peticiones se hará un duplicado del mismo.

Todos los resultados obtenidos a lo largo del día se pasarán al final del trabajo al ordenador y se emitirán los correspondientes volantes. Todos los volantes de salida deberán ser revisados por el encargado del

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

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. 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

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

El reconocimiento de la presencia de *Plasmodium* spp. y, aún más, la discriminación entre especies requiere de cierta experiencia. Las infecciones por más de una especie de *Plasmodium* spp. no son excepcionales en algunas zonas geográficas.

La incorrecta realización de la tinción o el exámen de extensiones teñidas por otros procedimientos (los habituales en el laboratorio de hematología o de urgencias) pueden inducir a error ya que, por ejemplo, pueden no teñirse las granulaciones eritrocitarias.

Las plaquetas superpuestas a los hematíes pueden dar lugar a imágenes dudosas. Las plaquetas nunca tienen los gránulos de cromatina de color rojo sino un color rojizo general.

En presencia de un parásito intraeritrocitario sólo puede tratarse de *Plasmodium* spp. o *Babesia* spp. La ausencia gametocitos y de pigmento malárico en las babesiosis y los datos epidemiológicos deben permitir el diagnóstico diferencial.

Si no fuese posible identificar el *Plasmodium* a nivel de especie se deberá recomendar un tratamiento como si fuese *P. falciparum* hasta que un centro de referencia lo identifique.

Procedimientos alternativos aceptables:

De forma sistemática se realizará una técnica de detección de antígenos de *Plasmodium* spp. con todas las muestras en las que se sospeche malaria (pero no necesariamente en los controles post-tratamiento).

Existen procedimientos de PCR y de detección de antígenos o de anticuerpos, que se pueden solicitar al Centro de Referencia de Majadahonda.

La tinción de Field es un método de tinción más rápido para el diagnóstico de malaria que se utiliza preferentemente en las zonas endémicas.

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, generalmente se emitirán telefónicamente al médico responsable. Si el paciente estuviese de alta se realizará todo el esfuerzo necesario para que sea informado del resultado y para que reciba tratamiento adecuado.

Todo el proceso puede realizarse en 2 horas.

Si se diagnostica una malaria en una guardia (fuera del horario de trabajo matutino o en día festivo), debe asegurarse el suministro de la medicación necesaria para el tratamiento.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Si la prueba es negativa, ante una historia clínica compatible con malaria se deben solicitar nuevas muestras cada 12 ó 24 horas y en casos muy graves evaluar la posibilidad de tratamiento empírico.

En algunas malarias graves el secuestro capilar de hematíes parasitados puede ser causa de falsos negativos.

La toma de antimaláricos y de algunos antibióticos (quinolonas, tetraciclinas, y otros) pueden enmascarar una malaria negativizando temporalmente la gota gruesa.

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

12. BIBLIOGRAFÍA

1.- Diagnostic Medical Parasitology. Lynne S. García 5th
Ed, ASM Press Washington, D.C. 2006.

2.- Coatney GR, Collins WE, Warren M, Contacos PG. The
Primate Malaria. U.S. Department of Health, Education
and Welfare, Bethesda, 1971.

Anexo I. Esquemas para la realización de las tinciones en capa fina y gruesa

<p align="center">TINCIÓN DE GIEMSA</p> <p>Tiñe hemoparásitos: <i>Plasmodium</i> spp., <i>Babesia</i> spp., <i>Leishmania</i> spp., <i>Trypanosoma</i> spp.</p>	
<p align="center">EXTENSIÓN FINA</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.- Coloque con una pipeta unos 5-10 µl de sangre en un extremo de un porta 2.- Extienda la sangre con la arista de otro porta con un ángulo de aprox. 40° 3.- Deje secar completamente la muestra 4.- Fije con metanol al 100% durante unos 5 minutos 5.- Deje secar el metanol 6.- Ponga en un tubo 9 ml de tampón fosfato (pH 7,2) y 1 ml de colorante de Giemsa 7.- Tiña la extensión invertida sobre una bandeja de vidrio durante 30 minutos 8.- Escurra, lave con agua destilada y deje secar 9.- Monte un cubreobjetos con líquido de montaje 10.- Examine las tinciones con objetivo de inmersión en aceite 	
<p align="center">GOTA GRUESA (sólo para <i>Plasmodium</i> spp.)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.- Coloque con una pipeta unos 50 µl de sangre en el centro de un porta 2.- Extienda un poco la sangre en el porta con un asa (una superficie de unos 4 cm²) 3.- Deje secar completamente 4.- NO CALIENTE NI FIJE CON METANOL 5.- Ponga en un tubo 9 ml de tampón fosfato (pH 7,2) y 1 ml de colorante de Giemsa. Mezclar y usar en el momento 6.- Tiña la extensión invertida sobre una bandeja de vidrio durante 30 minutos 7.- Retire con extremo cuidado para evitar que se pierda la muestra 8.- Escurrir, lavar CON MUCHO CUIDADO con agua destilada o tampón y dejar secar 9.- Monte un cubreobjetos con líquido de montaje 10.- Examine las tinciones con el objetivo de inmersión en aceite 	

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

Anexo II a. Características morfológicas de las diferentes especies de *Plasmodium*.

	Estadio	Aspecto del eritrocito	Aspecto del parásito
<i>P. falciparum</i>	Trofozoíto joven	Normal. Parasitación múltiple más frecuente que con otras especies La parasitemia puede ser >>2%	Anillo delgado con uno o dos puntos de cromatina. Algunos anillos “pegados” al lateral
	Trofozoíto maduro	Normal. A veces grietas de Maurer	Raros en sangre periférica, citoplasma compacto, hemozoína oscura
	Esquizonte	Normal. A veces grietas de Maurer	Muy raros en sangre periférica, de 8 a 24 merozoítos pequeños, un sólo grumo de hemozoína oscura
	Gametocito	Distorsionado o no visible	Ausentes en los primeros días de fiebre. Forma de plátano.
<i>P. malariae</i>	Trofozoíto joven	Tamaño normal o más pequeño, Parasitemias normalmente << 1%	Citoplasma compacto, cromatina grande, a veces centrada en el citoplasma
	Trofozoíto maduro	Tamaño normal o más pequeño	Citoplasma compacto, cromatina grande, a veces formas en banda, hemozoína marrón oscura, densa
	Esquizonte	Tamaño normal o más pequeño	Los maduros tienen 6-12 merozoítos con núcleo grande, rodeando un grumo de hemozoína marrón oscura (margarita)
	Gametocito	Tamaño normal o más pequeño	Redondo u oval, compacto, casi ocupa todo el hematíe, hemozoína marrón dispersa
<i>P. ovale</i>	Trofozoíto joven	Tamaño normal o algo aumentado, redondo u oval, a veces punteado de Schüffner, ocasional parasitación múltiple, parasitemia normalmente <2%	Citoplasma grande, a veces con pseudópodos, grueso punto de cromatina
	Trofozoíto maduro	Tamaño normal o algo aumentado, redondo u oval, algunos desflecados, punteado de Schüffner	Citoplasma grande, ameboides, hemozoína amarillenta
	Esquizonte	Tamaño normal o algo aumentado, redondo u oval, algunos desflecados, punteado de Schüffner	Cuando madura tiene de 6 a 14 merozoítos, rodeando un grumo de hemozoína marrón oscura
	Gametocito	Tamaño normal o algo aumentado, redondo u oval, algunos desflecados, punteado de Schüffner	Redondo u ovalado, casi ocupa todo el hematíe
<i>P. vivax</i>	Trofozoíto joven	Tamaño normal o algo aumentado, redondo, a veces punteado fino (Schüffner), ocasional parasitación múltiple, parasitemia normalmente <2%	Citoplasma grande, a veces con pseudópodos, grueso punto de cromatina
	Trofozoíto maduro	Tamaño aumentado, forma a veces distorsionada, punteado fino (Schüffner)	Citoplasma grande, ameboides, hemozoína amarillenta
	Esquizonte	Tamaño aumentado, forma a veces distorsionada, punteado fino (Schüffner)	Grande (casi llena el hematíe), cuando madura tiene de 12 a 24 merozoítos
	Gametocito	Tamaño aumentado, forma a veces distorsionada, punteado fino (Schüffner)	Redondo u ovalado, casi ocupa todo el hematíe

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

Anexo II b. Características morfológicas de las diferentes especies de *Plasmodium* y modificaciones de los hematíes parasitados.

Tamaño hematíe*	Membrana hematíe	Forma hematíe	Trofozoítos	Esquizontes	Gametocitos
= Pf = o ↓ Pm = o ↑ Po = o ↑↑ Pv	Membrana: Pv, Po, Algún punto alargado: Pf	Desflechado, oval: Po Irregular: Pv Normal: Pf, Pm	Sólo anillos, muchos, finos, 1 ó 2 puntos de cromatina: Pf	8-24: Pf (infrecuente) 6-12: Pm 6-14: Po 12-24: Pv	Alargado o curvo: Pf Redondo: Pm, Po, Pv

*=: igual tamaño del hematíe parasitado; ↓: disminución del tamaño del hematíe parasitado;

↑: aumento de tamaño del hematíe parasitado; Pf: *Plasmodium falciparum*; Pm: *Plasmodium malariae*;

Po: *Plasmodium ovale*; Pv: *Plasmodium vivax*.

Anexo III: Cálculo de la tasa de parasitemia

Recuento absoluto en gota gruesa:

Se deberá elegir una zona de la gota gruesa donde los parásitos estén bien teñidos y los leucocitos estén distribuidos de forma homogénea.

Si es posible, se debe obtener el número de hematíes y de leucocitos por microlitro de sangre que tenía el paciente en el Coulter más cercano en el tiempo al momento de la toma de la gota gruesa. Si eso no fuera posible, asumir que tenía 4000 leucocitos/ μ l y 5×10^6 hematíes/ μ l.

Al contar células de *Plasmodium* spp. ignorar (no contar) los gametocitos que se vean y contar como uno cada esquizonte.

Método 1:

Se multiplica x 500 la media del número de parásitos vistos en un campo con el objetivo de inmersión. La media se obtiene con los recuentos realizados en 10-50 campos de inmersión, según el grado de parasitemia.

Ejemplo: 200 trofozoítos de media por campo de inmersión x 500 = 10.000 trofozoítos/ μ l (parasitemia baja).

Método 2:

1.- Contar el número de parásitos y leucocitos que se observan por campo hasta alcanzar 200 leucocitos.

2.- Repetir el proceso en otras dos zonas de la gota gruesa y sacar la media de los tres recuentos.

3.- Calcular el número de parásitos por μ l de sangre como sigue:

$$\frac{\text{Recuento de leucocitos} \times \text{recuento de parásitos por 200 leucocitos}}{200}$$

$$\text{Ejemplo: } \frac{3.500 \text{ leucocitos}/\mu\text{l} \times 1000 \text{ parásitos}}{200} = 17.500 \text{ parásitos}/\mu\text{l}$$

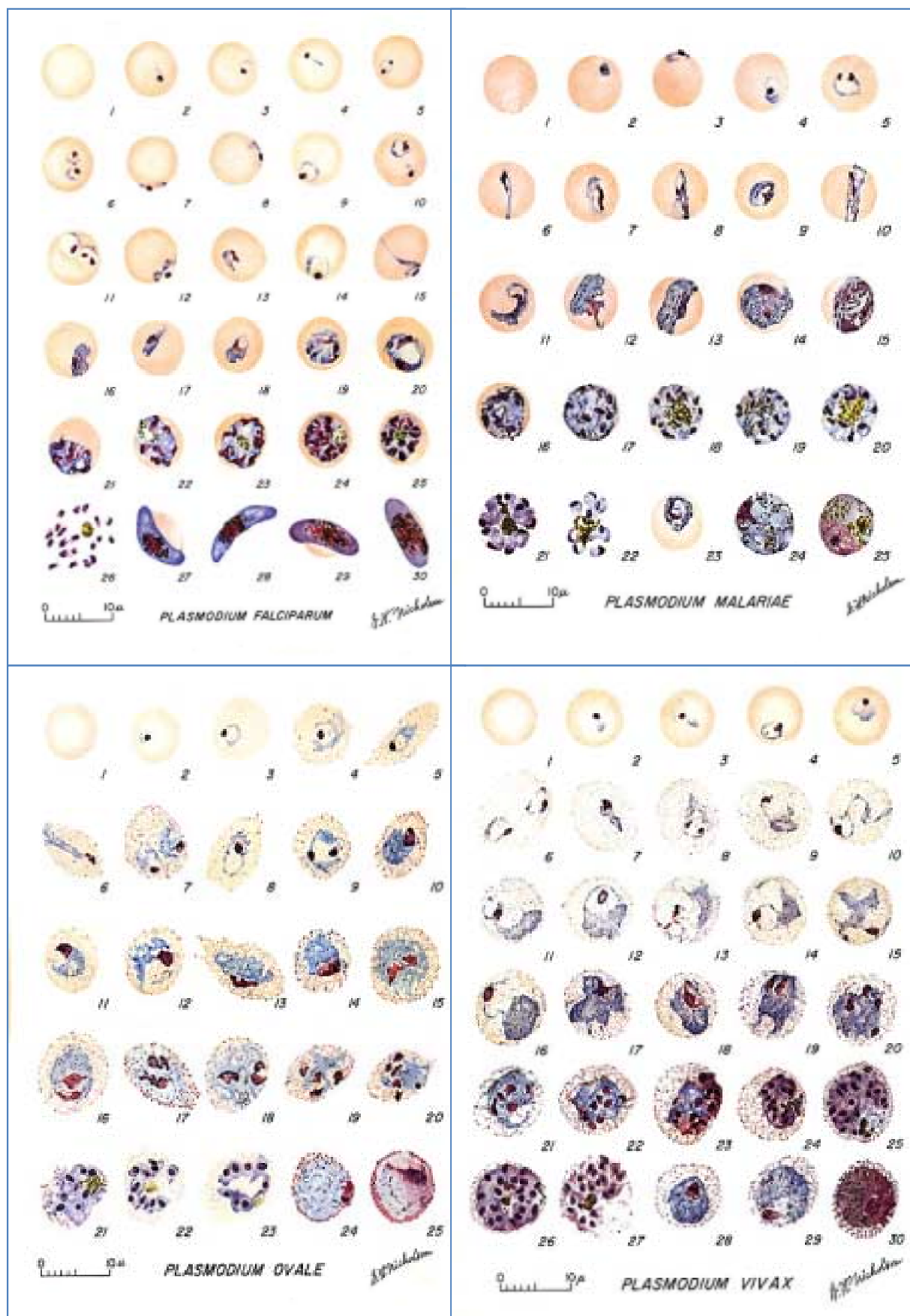
Recuento relativo en extensión fina:

1.- Con el objetivo de inmersión, seleccionar un área de la extensión fina con una densidad aproximada de 250 hematíes/campo.

2.- Contar el número de hematíes parasitados en 8 campos.

3.- Dividir por 20 para calcular el porcentaje (%) de células parasitadas.

Ejemplo de paciente con 4000 leucocitos y $5 \cdot 10^6$ hematíes		
% parasitemia	Plasmodios por μ l	Proporción plasmodios/leucocitos
0,01	500	5/40
0,1	5 000	5/4
1	50 000	50/4



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

Leyenda de las figuras:

Plasmodium falciparum

Figura 1: Eritrocito normal

Figuras 2-18: Trofozoítos. Figuras 2-10 trofozoítos jóvenes; 11-18 trofozoítos maduros

Figuras 19-26: Esquizontes (Figura 26 esquizonte roto)

Figuras 27, 28: Macrogametocitos (femenino); Figuras 29, 30: Microgametocitos (masculino)

Plasmodium malariae

Figura 1: Eritrocito normal

Figuras 2-13 trofozoítos; Figuras 2-5: trofozoítos jóvenes

Figura. 14-22: Esquizonte

Figur. 23: Gametocito en formación; Figura 24: Macrogametocito (femenino); Figura 25: Microgametocito (masculino)

Plasmodium ovale

Figura 1: Eritrocito normal

Figuras 2-15: Trofozoítos; (Figuras 2-5: Trofozoítos jóvenes)

Figuras 16-23: Esquizonte

Figura 24: Macrogametocito (femenino); Figura 25: Microgametocito (masculino)

Plasmodium vivax







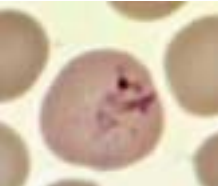







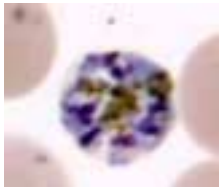

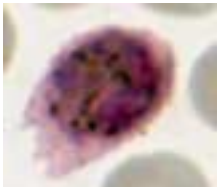




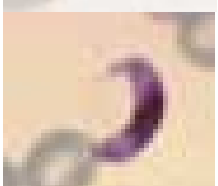




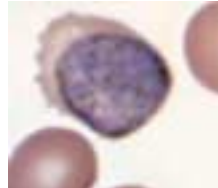

Figura 1: Eritrocito normal

Figuras 2-18: Trofozoítos; Figuras 2-6: Trofozoítos jóvenes

Figuras 19-27: Esquizonte

Figura 28: Macrogametocito (femenino); Figura 29: Microgametocito (masculino)

Detalle morfológico de las diferentes especies de *Plasmodium*

<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. vivax</i>
Trofozoítos	Trofozoítos	Trofozoítos	Trofozoítos
  	  	  	  
Esquizontes	Esquizontes	Esquizontes	Esquizontes
 	 	 	 
Gametocitos	Gametocitos	Gametocitos	Gametocitos
 	 	 	 

Ilustraciones originales de: Coatney GR, Collins WE, Warren M, Contacos PG. The Primate Malaria. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Bethesda, 1971

PNT-PI-02
DETECCIÓN DE ANTÍGENOS DE *Plasmodium* spp.

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

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital..... 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 de Microbiología Hospital.....	Detección de antígenos de <i>Plasmodium</i> spp.	PNT-PI-02	
		Edición N° 01	Página 2 de 5

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir uno de los métodos actualmente comercializados de detección de antígenos de *Plasmodium* spp. en muestras de sangre total. En la página Web de la OMS se incluye un listado con la mayoría de los equipos comercializados actualmente que cumplen la norma ISO13485:2003 (<http://www.wpro.who.int/sites/rdt>, última fecha de acceso 5/10/2009)

El presente documento está dirigido a la realización del método de inmunocromatografía comercializado de uso mas extendido en España. Los usuarios de otros productos comerciales deberán incorporar las modificaciones necesarias.

Esta prueba debe realizarse ante la sospecha clínico-epidemiológica de malaria, empleando muestras de sangre total.

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

2. FUNDAMENTO

Los protozoos del género *Plasmodium* son unos microorganismos que parasitan los hematíes y producen una enfermedad febril llamada malaria o paludismo.

El análisis objeto de este procedimiento detecta por inmunocromatografía la presencia de aldolasa, un antígeno común a *Plasmodium falciparum*, a *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae* y, de forma separada, otro antígeno llamado HPR2 (*histidine-rich protein number 2*) presente sólo en *P. falciparum*. En una banda de la tira de reactivo están fijados un control de reactividad y cada uno de los antígenos. La tira adquiere una tonalidad rojiza cuando detecta la presencia del antígeno.

La presencia de uno o ambos antígenos es indicativa de malaria y orientativa respecto a la especie causal. La identificación definitiva a nivel de especie debe realizarse mediante la tinción de Giemsa de extensiones finas de sangre (y técnicas de PCR en un centro de referencia).

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Loza E (Coordinador). Alomar P, Bernal A, Harto A, Pérez JL, Picazo JJ, Sarazá LL. Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica. Procedimientos en Microbiología nº 10, 1ª edición. SEIMC. 2000. Disponible en:

<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

- Sánchez C (Coordinador), Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología nº 1 a, 2ª edición. SEIMC. 2003. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

- Prospecto con las instrucciones del fabricante presente en cada caja de reactivos.

4. MUESTRAS

Son muestras aceptables:

- Sangre anticoagulada con EDTA (tubo de Coulter, tapón morado) o heparina (tapón verde).
- Sangre capilar obtenida en el laboratorio mediante punción del pulpejo del dedo.

Los criterios de aceptación y rechazo son responsabilidad del área de recepción de muestras y están especificadas en el correspondiente PNT del procedimiento de recogida de muestras (SEIMC, 2003).

La muestra se recepcionará en el área 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 y otros datos epidemiológicos de interés diagnóstico.

Toda sospecha de malaria o petición de gota gruesa se considerará urgente y se procesará como tal, realizando por sistema la detección de antígenos de *Plasmodium* spp., gota gruesa y extensión fina teñidas con Giemsa (ver PNT-PI-01 de este procedimiento).

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Reactivos y productos:

- Tarjeta de reacción
- Envase de goteo con reactivo de arrastre
- Tubos capilares recubiertos de EDTA.

Conservación y fechas de caducidad:

- La caja de reactivos se conservará habitualmente en nevera (2-8°C) salvo que el fabricante recomiende otra cosa. Los reactivos mantenidos a temperatura ambiente caducan en un periodo de tres meses empezando a contar desde la fecha en que se dejen de refrigerar (siempre que dicha fecha no sea posterior a la fecha de caducidad escrita en la caja). En general no se utilizarán 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 durante el mes siguiente a la fecha de caducidad, como complemento al examen microscópico de la muestra, pero no se podrá informar el resultado de la detección de antígenos de *Plasmodium* spp.

- Ningún material continuará usándose cuando se observen signos de deterioro.

6. APARATOS Y MATERIALES

- Guantes
- Ninguno adicional salvo los incluidos en el *kit*
- Opcionalmente pipeta automática para dispensar 15 µl

7. PROCESAMIENTO

(ver esquema en el anexo I)

1.- Saque la tarjeta de la bolsa. Márquela con la fecha y número de muestra.

2.- Abra la tarjeta y deje que el Reactivo A se

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de antígenos de <i>Plasmodium</i> spp.	PNT-PI-02	
		Edición N° 01	Página 3 de 5

atempere.

3.- Ponga 15 µl de sangre **poco a poco en la parte inferior de la almohadilla violeta** (flecha 1) de la tira de reacción.

4.- Destape el reactivo A y seque la punta del gotero.

5.- Con el gotero verticalmente deje caer dos gotas en la sección blanca de debajo (flecha 2).

6.- Ponga cuatro gotas en la almohadilla superior del lado izquierdo de la tarjeta (flecha 3).

7.- La sangre será arrastrada hacia la parte superior de la tira de reacción. Cuando la sangre llegue a la almohadilla superior, retire la tira que protege la banda adhesiva y cierre la tarjeta presionando fuertemente sobre la zona del adhesivo. Si observa que la migración de la muestra sobre la tira se detiene o alcanza menos de la mitad de la tira después de un minuto, añada una gota adicional de Reactivo-A a la almohadilla, justo por debajo de donde se puso la sangre. Si no llegó hasta arriba y la sangre de la tira se ha secado, coja una nueva tarjeta y repita el test.

8.- Lea la reacción a través de la ventanilla sobre la tira reactiva **a los 15 minutos**. Si existe una banda visible, aunque sea muy tenue, el resultado es **POSITIVO**.

9.- Guarde la tarjeta en el archivo de muestras analizadas.

10.- Registre el resultado en la hoja de trabajo.

Controles:

Controles externos: se recomienda controlar de forma periódica los resultados con una técnica de referencia como la PCR.

Controles internos: la caja de reactivos no incluye muestras de control ni las hay comercialmente disponibles. A medida que se vayan acumulando resultados positivos se prepararán alícuotas de los mismos que se congelarán. Estos controles se utilizarán cuando se produzcan resultados

discordantes de la detección de antígeno con la tinción de Giemsa (situación en la que es necesario repetir la detección de antígeno y que un microscopista experto revise la tinción).

Periódicamente, los responsables de Calidad del servicio incluirán controles positivos abiertos y ciegos para el propio técnico 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 en el procesamiento de la muestra o del examen microscópico y se establecerán las medidas correctoras correspondientes.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

A través de la ventanilla de la tarjeta se podrá llegar a ver un máximo de tres líneas de color identificadas de arriba abajo como C, T1 y T2.

La ausencia de la banda C (control) invalida el test.

La presencia de la banda T1 o Pf (Ag. HRP2) es indicativa de *P. falciparum*.

La presencia de la banda T2 (aldolasa) en ausencia de T1 es indicativa de *P. vivax*, *P. ovale* o *P. malariae*.

La presencia sólo de la banda C indica resultado negativo.

Todos los resultados positivos se comentarán de inmediato al responsable del área. Se informarán inmediata y telefónicamente los resultados con hallazgos significativos y previa consulta al encargado del área.

Todos los resultados obtenidos a lo largo del día se registrarán en la hoja de trabajo, se pasarán finalmente al ordenador y se emitirán los correspondientes volantes. Todos los volantes de salida deberán ser firmados y revisados por el responsable del área.

Bandas visibles	Interpretación
"C + T1"	Positivo (<i>P. falciparum</i>)
"C + T1 + T2"	Positivo (<i>P. falciparum</i>) Solo o con otras especies
"C + T2"	Positivo (<i>P. no falciparum</i>) <i>P. vivax</i> , <i>P. ovale</i> , <i>P. malariae</i> o <i>P. knowlesi</i>
Sólo C	Negativo
Ausencia de "C" Sólo "T1" o "T2" o "T1 y T2"	Ininterpretable Error de ejecución o reactivo defectuoso

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de antígenos de <i>Plasmodium</i> spp.	PNT-PI-02	
		Edición N° 01	Página 4 de 5

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

Advertencias:

La técnica puede tener falsos negativos con plasmodios no *falciparum*, sobre todo en infección por *P. ovale* o *P. malariae*. Se han descrito falsos positivos en una cuarta parte de los individuos con factor reumatoide positivo (Adv Exp Med Biol. 2003;531:135-148).

Es imprescindible realizar la técnica exactamente

como se indica en este procedimiento, y especialmente mantener la precisión al añadir los reactivos: la forma y orden de dispensación, número de gotas y su tamaño (una gota en caída libre desde un gotero seco invertido y en posición vertical).

El reactivo A contiene azida de sodio que es tóxica y produce compuestos explosivos al reaccionar con los metales. Si se desecha por el fregadero (y los desagües son de plomo), se debe dejar correr el agua unos minutos.

Procedimientos alternativos aceptables:

El examen microscópico de la muestra teñida con la tinción de Giemsa.

Las técnicas de PCR permiten confirmar retrospectivamente la especie infectante y detectar con seguridad infecciones causadas por más de una especie. Su uso sistemático en toda sospecha de malaria para confirmar los resultados (tanto positivos como negativos) obtenidos por otras técnicas permite controlar la calidad del diagnóstico.

Para el estudio de una esplenomegalia de individuos con exposición a malaria (esplenomegalia tropical) se deberá realizar la PCR de *Plasmodium* spp. siempre que sea posible. También puede ser útil la detección de anticuerpos anti-*Plasmodium*.

Tiempo de entrega de muestras urgentes:

Todo el proceso de detección de antígeno puede realizarse en menos de quince minutos. La tinción de Giemsa puede llevar unos 90-120 minutos.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El fabricante recomienda el test sólo en el diagnóstico de pacientes sintomáticos. No debe utilizarse en pacientes asintomáticos ni en el cribado de malaria en donantes de sangre. Tampoco debe utilizarse en el control del tratamiento porque las pruebas pueden continuar positivas hasta 4 semanas después de administrar tratamiento eficaz. La positividad del procedimiento debe interpretarse en presencia de un cuadro clínico compatible. En general, si se detecta antígeno de *Plasmodium* spp. después de dos meses de finalizar el último tratamiento antimalárico, es muy probable la parasitación.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Garcia LS. Diagnostic Medical Parasitology. 5ª Edición, ASM Press Washington, D.C. 2007.
2. Murray CK, Gasser RA Jr, Magill AJ, Miller RS. Update on rapid diagnostic testing for malaria. Clin Microbiol Rev. 2008; 21:97-110.
3. <http://www.wpro.who.int/sites/rdt/>: Página de la OMS que proporciona:
 - Recomendaciones respecto al uso de test rápidos de malaria en programas de control de la enfermedad, en centros sanitarios y en otras situaciones.
 - Guías para evaluar estos tipos de pruebas analíticas.
 - Información para usuarios y fabricantes sobre los resultados del programa de evaluación de estos tests llevado a cabo por la O.M.S.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de antígenos de <i>Plasmodium</i> spp.	PNT-PI-02	
		Edición N° 01	Página 5 de 5

Anexo I. Esquema de trabajo para la detección antígenos de *Plasmodium* spp.

<p align="center">Detección de antígenos de <i>Plasmodium</i> spp.</p>
<p>Procesamiento:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.- Saque la tarjeta de la bolsa. Márquela con la fecha y número de muestra. 2.- Abra la tarjeta y manténgala permanentemente en posición horizontal. 3.- Ponga poco a poco 15 µl de sangre en la zona inferior de la almohadilla violeta (flecha 1). 4.- Destape el reactivo A y seque la punta del gotero. 5.- Con el gotero verticalmente deje caer dos gotas en la sección blanca absorbente por debajo de donde se puso la sangre (flecha 2). Puede ser necesario añadir una gota más. 6.- Ponga cuatro gotas en la almohadilla superior del lado izquierdo de la tarjeta (flecha 3). 7.- La sangre será arrastrada hacia la parte superior de la tira de reacción. En cuanto la sangre llegue a la almohadilla superior, quite el papel que protege la tira adhesiva y cierre la tarjeta presionando fuertemente. 8.- Lea la reacción con buena iluminación a los 15 minutos. No hay que abrir la tarjeta. 9.- Guarde la tarjeta el archivo de muestras analizadas. 10.- Registre el resultado en la hoja de trabajo.

PNT-PI-03
Detección de *Trypanosoma* spp. en sangre

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

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital..... 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 de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Trypanosoma</i> spp. en sangre	PNT-PI-03	
		Edición N° 01	Página 2 de 5

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 de los que hay dos especies principales patógenas para el hombre: *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. El *Trypanosoma rangelli*, 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 precoces, pudiendo reaparecer en periodos de inmunodepresión. En la tripanosomiasis africana la parasitemia aparece en fase aguda y se hace intermitente en la fase crónica.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Loza E (Coordinador). Alomar P, Bernal A, Harto A, Pérez JL, Picazo JJ, Sarazá LL. Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica. Procedimientos en Microbiología n° 10, 1ª edición. SEIMC. 2000. Disponible en:

<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

- Sánchez C (Coordinador), Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología n° 1 a, 2ª edición. SEIMC. 2003. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

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

[http://whqlibdoc.who.int/publications/9243544101_\(part1\).pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/9243544101_(part1).pdf)

[http://whqlibdoc.who.int/publications/9243544101_\(part2\).pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/9243544101_(part2).pdf)

- Información de diagnóstico de los *Centers for*

Disease Control. Disponible en:

<http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm>

- Manual de gestión de residuos del laboratorio.

4. MUESTRAS

Son muestras aceptables:

- Para microhematocrito: sangre anticoagulada con EDTA (tubo de Coulter) o con heparina.

- Para la técnica de Strout: sangre extraída en tubo sin anticoagulante. La visualización es más sensible cuanto antes se realiza la técnica (preferiblemente en las 4 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 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

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 MATERIALES

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 (Tapón azul)

- Rotulador permanente

- Pipetas Pasteur (estériles)

- Portaobjetos

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Trypanosoma</i> spp. en sangre	PNT-PI-03	
		Edición N° 01	Página 3 de 5

- Cubreobjetos de 24x24 mm
 - Cuaderno y lápiz para el registro
 - Tubo de plástico transparente y flexible (tipo sistema de infusión i.v.) cortado a 4 - 8 cm de largo.
 - 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. PROCESAMIENTO

El método del microhematocrito para detección de *Trypanosoma* spp. data de los años 70. Actualmente este tipo de centrífugas de microhematocrito ha caído en desuso. El procedimiento que se describe a continuación es una adaptación de la técnica del microhematocrito para poderla realizar 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 anticoagular en adultos (ver método 7.2).

7.1. PROCEDIMIENTO 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 campana de flujo laminar.
- 2.- Prepare el material necesario. Coloque varias capas de papel de filtro en la zona de trabajo.
- 3.- 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.
- 4.- Cargue de sangre 6 capilares de microhematocrito. Cierre un extremo de cada tubo clavándolos en plastilina. Si dispone de una centrífuga de microtubos procéselos a 3000 xg durante 4 minutos y continúe en el punto número 8.
- 5.- Ponga dos capilares en cada tubo de centrífuga con el polo tapado con plastilina hacia la parte inferior del tubo. Tape los tubos.
- 6.- Centrifugue 10 minutos a 900 xg.
- 7.- 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.
- 8.- 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.

9.- Proteja el capilar con el tubo de plástico flexible y pártalo en dos cuidadosamente, manteniendo el capilar en posición horizontal.

10.- Descargue el grumo de leucocitos y plaquetas (que debería haber quedado en el extremo donde está el plasma) en un porta, ponga un cubreobjetos y examine toda la muestra inmediatamente con el objetivo de 10x en busca de organismos móviles.

11.- Repita los puntos 8 al 10 con el resto de los capilares. Es aconsejable que el material obtenido de al menos uno de los capilares se extienda en un porta 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.

12.- 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 ...).

13.- Recoja el material, tire los capilares de forma segura. Si procede, deje en la nevera la sangre sobrante para realizar una PCR de *T. cruzi* 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 campana de flujo laminar.
- 2.- Prepare el material necesario. 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 otro porta para 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 ...).
- 10.- Recoja el material, tire el material fungible de forma segura. Si procede, deje en la nevera la

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Trypanosoma</i> spp. en sangre	PNT-PI-03	
		Edición N° 01	Página 4 de 5

sangre sobrante para realizar una PCR de *T. cruzi* 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 deberá confirmar los resultados positivos, y en ocasiones será más sensible.

- 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.

- 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 de gametocitos exflagelados.

- *Trypanosoma rangelli* es morfológicamente similar al *Trypanosoma brucei* pero es endémico de zonas de Iberoamérica y en algunas zonas de Centroamérica es mas frecuente que el *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 al menos para tratar de confirmar sospechas de infección no demostradas microscópicamente o de interés epidemiológico.

Procedimientos alternativos aceptables:

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Trypanosoma</i> spp. en sangre	PNT-PI-03	
		Edición N° 01	Página 5 de 5

- El observar una gota de sangre en fresco puede ser suficiente para hacer un diagnóstico si la parasitemia es alta. En general conviene hacerlo antes de empezar el procedimiento de concentración. Si los hematíes se han sedimentado algo, la muestra debe tomarse de la parte inferior del suero sobrenadante.
- Este examen en fresco inmediato es el recomendado así como el examen 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.
- 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 minutos, tomar el sobrenadante y centrifugarlo a 500 xg 10 minutos,

tomar el sobrenadante y centrifugarlo a 900 xg 10 minutos y observar el sedimento de este tercer tubo).

Tiempo de entrega de resultados de muestras urgentes:

- Todo el proceso puede llegar a realizarse en menos de 3 horas. La confirmación de un resultado por parte de un especialista con experiencia o de un centro de referencia puede tardar más de un día.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- La negatividad del examen no excluye la parasitación, especialmente en casos de infección adquirida hace años.
- En la enfermedad de Chagas durante la fase indeterminada y en la infección crónica el examen microscópico de sangre suele ser negativo y ocasionalmente pueden positivizarse durante periodos de tiempo.
- 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.

Anexo I. Procedimiento del microhematocrito para detección de *Trypanosoma* spp. en sangre

TRIPANOSOMAS EN SANGRE: CONCENTRACIÓN POR MICROHEMATOCRITO	
iii 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 (.....rpm en la centrífuga 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 porta, ponga un cubreobjetos y examine con el objetivo de 10x en busca de organismos móviles. 9.- Repita los puntos 8 al 9 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). 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. 11.- Registre los resultados del examen directo y emita un informe. 12.- Recoja el material, tire los capilares de forma segura. 13.-Considere conservar parte de la sangre sobrante si va a ser necesaria para realizar una detección molecular de <i>Trypanosoma</i> spp. mediante PCR.	

PNT-PI-04
DETECCIÓN DE *Leishmania* spp. EN MUESTRAS CLÍNICAS

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

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital..... 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 de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Leishmania</i> spp. en muestras clínicas	PNT-PI-04	
		Edición N° 01	Página 2 de 5

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 afectan a cualquier tipo de hospedador mientras que las formas viscerales se producen fundamentalmente en niños pequeños y en adultos inmunodeprimidos o malnutridos.

La infección por este protozoo se diagnostica habitualmente mediante serología, por 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.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Loza E (Coordinador). Alomar P, Bernal A, Harto A, Pérez JL, Picazo JJ, Sarazá LL. Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica. Procedimientos en Microbiología n° 10, 1ª edición. SEIMC. 2000.

Disponible en:

<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

- Atlas of medical parasitology. Fundación Carlo Denegri, Clínica de Enfermedades Infecciosas de la Universidad de Turín y Hospital Amadeo de Saboya.

http://www.cdfound.to.it/_atlas.htm

- Atlas de parasitología del laboratorio.

4. MUESTRAS

Son muestras aceptables:

1.- Sangre anticoagulada preferiblemente con heparina (tapón verde). La sangre anticoagulada con EDTA (tubo de Coulter, tapón morado) es aceptable.
2.- Médula ósea, biopsias, punción-aspiración e improntas de cualquier tejido sospechoso de afectación por *Leishmania* spp. Ocasionalmente secreciones respiratorias u otras muestras.

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 y otros posibles datos epidemiológicos de interés diagnóstico.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

Reactivos y productos:

- Metanol grado técnico.
- Tampón fosfato pH 7,2
- Tampón PBS pH 7,4 estéril
- Reactivo de Giemsa
- Suero fisiológico
- Agua destilada
- Aceite de inmersión
- Solución de dextrano al 6% estéril.
- 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 de 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 PBS pH 7,4, el dextrano y el medio NNN se conservarán en nevera. El resto se conserva a temperatura ambiente.

6. APARATOS Y MATERIALES

Material fungible:

- Guantes de látex
- Tubos estériles
- Rotulador permanente
- Pipetas Pasteur (estériles)
- Portaobjetos
- Cubreobjetos de 24x24mm
- Cuaderno y lápiz para el registro

Aparatos:

- Microscopio
- Incubadora de 37° C

7. PROCESAMIENTO

A) Sangre periférica (ver esquema Anexo I)

- 1.- Póngase guantes de látex. Considere la muestra como potencialmente infectante.
- 2.- Prepare el material necesario. Utilice técnica estéril.
- 3.- Poner 5 ml de sangre en un tubo con 1,5 ml de dextrano al 6% (o bien 3 ml de sangre en 0,9 ml de dextrano al 6%).
- 4.- Cerrar y mezclar invirtiendo el tubo suavemente varias veces.
- 5.- Aflojar el tapón. Incubar a 37°C durante 30-45 minutos.
- 6.- Trasegar el sobrenadante a un tubo con 5 ml de PBS pH 7,4.
- 7.- Centrifugar 5 minutos a 2000 r.p.m.
- 8.- Elimine el sobrenadante.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Leishmania</i> spp. en muestras clínicas	PNT-PI-04	
		Edición N° 01	Página 3 de 5

9.- Con el sedimento haga una extensión gruesa en un porta.

10.- Ponga el resto del sedimento en un tubo de NNN y déjelo en incubación a temperatura ambiente.

11.- Deje secar completamente la extensión del porta.

12.- Fíjela con metanol al 100% durante 5 minutos.

13.- Deje secar el metanol.

14.- Tiña con colorante Giemsa diluido 1/10 en buffer durante 30 minutos.

15.- Examine la extensión con los objetivos de 40x y 100x.

16.- Anote los resultados del examen directo en el cuaderno y posteriormente en la hoja del libro de registro.

17.- Los cultivos se examinarán dos o tres veces por semana durante al menos un mes. 18.- Se debe llevar un registro de cuándo se examinan las muestras relleno una hoja de control de Cultivos de *Leishmania* spp.

19.- Para detectar crecimiento en los cultivos examine en fresco una pequeña cantidad de líquido entre porta y cubre con el objetivo de 20x ó 40x. Evite la formación de aerosoles y utilice una campana de flujo laminar que proteja de contaminaciones a la muestra y al usuario.

B) Médula ósea y otras muestras

Con las muestras de médula ósea se comenzará el procesamiento en el punto 9, así como con las muestras de tejido que se macerarán previamente en un pequeño volumen de suero fisiológico.

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, INTERPRETACIÓN 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 volantes.

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

- Si el resultado es positivo 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 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.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Leishmania</i> spp. en muestras clínicas	PNT-PI-04	
		Edición Nº 01	Página 4 de 5

Las solicitudes urgentes durante las guardias se atenderán siguiendo los procedimientos previstos para estas 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 campana 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 la identificación de especie se deberá mandar un tubo de NNN o de un medio equivalente, con la cepa en cuestión al Centro Nacional de Referencia de Parasitología de Majadahonda.

En muestras teñidas suele ser mucho mas fácil encontrar amastigotes extracelulares (procedentes de células rotas) que intraleucocitarios. La presencia de un organismo con un núcleo y un quinetoplasto 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 quinetoplasto 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).

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. Los cultivos habitualmente son positivos entre los 5 y los 15 días de incubación pero pueden tardar hasta 4 semanas.

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 (cerca 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.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Leishmania</i> spp. en muestras clínicas	PNT-PI-04	
		Edición N° 01	Página 5 de 5

Anexo I. Esquema del procesamiento para tinción de *Leishmania* spp.

<i>Leishmania</i> spp. EN SANGRE
<p>Procedimiento :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1- Póngase guantes de látex. Considere la muestra como si estuviera infectada por el VIH. 2- Prepare el material necesario. Utilice técnica estéril. 3- Poner 5 ml de sangre en un tubo con 1,5 ml de dextrano al 6% (o bien 3 ml de sangre en 0,9 ml de dextrano al 6%) 4- Cerrar y mezclar invirtiendo el tubo suavemente varias veces. 5- Aflojar el tapón. Incubar a 37°C durante 30-45 minutos. 6- Trasegar el sobrenadante a un tubo con 5 ml de BPS pH 7,4 7- Centrifugar 5 minutos a 2000 r.p.m. 8- Eliminar el sobrenadante. 9- Con el sedimento haga una extensión gruesa en un portaobjetos. 10- Ponga el resto del sedimento en un tubo de NNN y déjelo cerrado a temperatura ambiente. 11- Déje secar completamente la extensión del portaobjetos. 12- Fíjela con metanol al 100% durante unos cinco minutos. 13- Deje secar el metanol. 14- Tiña con colorante Giemsa diluido 1/10 en buffer durante 30 min. 15- Examine la extensión con los objetivos de 40x y 100x. 16- Registre los resultados. 17- Los cultivos se examinarán dos o tres veces por semana durante al menos un mes. 18- Para detectar crecimiento en los cultivos examine en fresco una pequeña cantidad de líquido entre portaobjetos y cubreobjetos con el objetivo de 20x ó 40x.

PNT-PI-05
EXAMEN DE FILARIAS EN SANGRE

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

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital..... 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 de Microbiología Hospital.....	Examen de filarias en sangre	PNT-PI-05	
		Edición N° 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir el método de detección y tinción de filarias hemáticas. 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 algunos de los cuales circulan durante un periodo de su ciclo vital (las microfilarias) por el torrente sanguíneo humano. Dado que el número de microfilarias puede ser bajo (menos de una por mililitro) es necesario realizar un procedimiento de concentración para detectarlas. Como tienen un tamaño mucho mayor que las células hemáticas (decenas de micrómetros) se las puede "pescar con red" haciendo pasar un volumen grande de sangre a través de un filtro de un diámetro adecuado (3-5 μ m) que retendrá las filarias y dejará pasar hematíes, plaquetas y leucocitos.

Posteriormente se pueden identificar mediante una tinción de Giemsa similar a la empleada para *Plasmodium* spp. (ver PNT-PI-01 de este procedimiento).

Para el diagnóstico de filariasis, ante la sospecha clínico-epidemiológica, habitualmente se emplean muestras de sangre periférica, pero también puede realizarse el diagnóstico con sangre capilar.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Loza E (Coordinador). Alomar P, Bernal A, Harto A, Pérez JL, Picazo JJ, Sarazá LL. Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica. Procedimientos en Microbiología n° 10, 1ª edición. SEIMC. 2000. Disponible en:

<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

- Atlas of medical parasitology. Fundación Carlo Denegri, Clínica de Enfermedades Infecciosas de la Universidad de Turín y Hospital Amadeo de Saboya.

http://www.cdfound.to.it/_atlas.htm

- Atlas de parasitología del laboratorio.

- Manual de gestión de residuos del laboratorio.

4. MUESTRAS

Son muestras aceptables:

- Sangre anticoagulada con EDTA (tubo de Coulter, tapón morado) o heparina (tapón verde).

- Sangre capilar obtenida en el laboratorio mediante punción del pulpejo del dedo (para examen de gota gruesa, sin realizar concentración por filtrado).

El procesamiento debe realizarse lo antes posible, aunque son aceptables muestras conservadas en nevera por un periodo no superior a las 48 horas.

La muestra se recepcionará en el área acompañada de la copia del volante de petición donde se comprobará qué entidad nosológica sospechada que ha originado la petición y otros posibles datos epidemiológicos de interés diagnóstico.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Reactivos y productos:

- Metanol grado técnico.
- Tampón PBS pH 7,2.
- Reactivo de Giemsa
- Agua destilada
- Aceite de inmersión
- Formol
- Líquido de montaje permanente para cubreobjetos

Conservación y fechas de caducidad:

Las fechas de caducidad no son críticas para ninguno de los pasos de 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. Los materiales empleados deberán estar limpios, no necesariamente estériles. Todos los materiales mencionados se conservan a temperatura ambiente.

6. APARATOS Y MATERIALES

Material fungible:

- Guantes de Látex
- Tubos graduados de 15 ml de polietileno
- Jeringuilla de 10 ml de volumen
- Filtros desechables de 3-5 micrómetros nominales de poro
- Rotulador permanente
- Pipetas Pasteur (no estériles)
- Portaobjetos
- Cubreobjetos de 24x60mm
- Cuaderno y lápiz para el registro

Aparatos:

- Microscopio
- Contenedores reutilizables de soporte de los filtros

7. PROCESAMIENTO

(ver esquema de procesamiento en el anexo I)

1. Póngase guantes de látex.
2. Prepare el material necesario y ponga hojas adicionales de papel de filtro en la zona de trabajo.
3. Extraiga con una pipeta el total de sangre remitida y fuerce su paso a través de la membrana del filtro presionando suavemente.
4. Cargue la jeringa con 10 ml de agua destilada y páselos por el filtro.
5. Repita el paso anterior dos veces más.
6. Pase a través del filtro 3-4 ml de formol. Espere 5 minutos.
7. Pase por el filtro 10 ml de agua destilada para eliminar el exceso de formol.
8. Pase por el filtro 10 ml de aire para eliminar los restos del líquido.
9. Abra el contenedor del filtro, saque la membrana con unas pinzas y deposítela extendida en un portaobjetos.
10. Déjela secar completamente.
11. Fíjela con metanol al 100% durante 5 minutos.
12. Deje secar el metanol.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Examen de filarias en sangre	PNT-PI-05	
		Edición N° 01	Página 3 de 4

13. Tiña con colorante Giemsa diluido 1/10 en buffer.
14. Toda la superficie de la membrana se debe examinar con el objetivo de 10x o de 20x. Las imágenes sospechosas se examinarán a mayor aumento (ver Figuras 1 y 2).
15. Anote los resultados en el cuaderno y posteriormente en la hoja del libro de registro. Los negativos se anotarán como “negativo” y en los positivos se indicará el género y especie del parásito o parásitos visualizados.
16. Descarte las muestras negativas examinadas, los portas y las pipetas Pasteur utilizadas en un contenedor adecuado. Limpie con lejía el recipiente de sujeción del filtro. Apague, limpie y cubra el microscopio. Limpie toda la zona de trabajo.

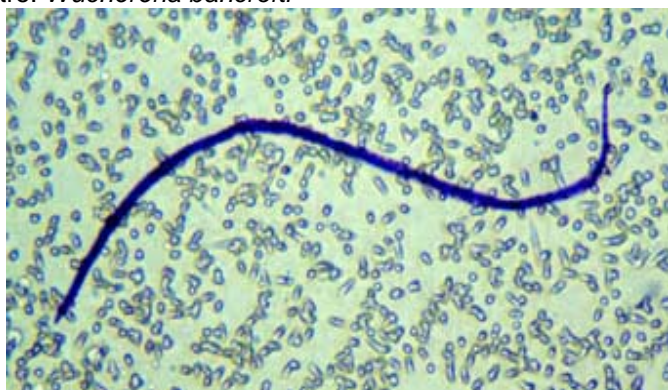
Controles:

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. Los resultados (positivos o negativos) deberán ser supervisados por el responsable del área antes de que se emitan.

Figura 1. Tinción con Giemsa de filarias en sangre
Mansonella perstans Loa loa



Figura 2. Tinción con Giemsa de filarias sobre el filtro. *Wuchereria bancrofti*



8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Los parásitos se identificarán visualmente, sobre la base de su tamaño, características tintoriales y morfología.

Todos los resultados positivos o negativos se comentarán de inmediato al responsable del área. Se

informarán inmediata y telefónicamente los resultados con hallazgos significativos y previa consulta al responsable del área..

Si el resultado es positivo se informará como: “Tinción de Giemsa: se observan parásitos”, indicando el género y especie de la microfilaria identificada.

Si el resultado es negativo se informará como: “Tinción de Giemsa: no se observan microfilarias”.

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

Todos los resultados obtenidos a lo largo del día se pasarán al final del trabajo al ordenador y se emitirán los correspondientes volantes. Todos los volantes de salida deberán ser revisados 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

Servicio de Microbiología Hospital.....	Examen de filarias en sangre	PNT-PI-05	
		Edición N° 01	Página 4 de 4

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

Reconocimiento de filarias y posibles causas de error:

- El reconocimiento de la presencia de filarias, y aún más la discriminación entre especies requiere de cierta experiencia. Las infecciones por más de una especie no son excepcionales en algunas zonas geográficas.
- La incorrecta realización de la tinción o el examen de extensiones teñidas por otros procedimientos (los habituales en el laboratorio de hematología o de urgencias) 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 sangre recogida a distintas horas del día (al menos a media noche y a medio día).
- Algunas especies de filarias no se pueden diagnosticar por un examen de sangre ya que sólo se suelen encontrar en tejido cutáneo (*Oncocerca volvulus*).

Procedimientos alternativos aceptables:

- Existen procedimientos de detección de antígenos o de anticuerpos, que se pueden solicitar al Centro de Referencia de Parasitología de Majadahonda en casos seleccionados.

- La concentración también puede hacerse por métodos de centrifugación-sedimentación (similares a los empleados en el área de hemocultivos) lisando los hematíes con saponinas o con agua destilada. Si se hace mediante lisis se debe observar todo el sedimento en fresco o teñido con Giemsa (varias extensiones).

Tiempo de entrega de muestras urgentes:

- Como las filariasis son infecciones crónicas no se suelen considerar una urgencia diagnóstica ni terapéutica.
- Todo el proceso 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.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- La prueba puede ser negativa lo que no excluye la parasitación ante una historia compatible y se deben solicitar nuevas muestras cada 12-16 horas.
- En algunos pacientes con microfilaremia indetectable se ha empleado el test de Mazzoti (administrar una dosis baja de dietilcarbamacina, ver documento científico de este procedimiento) para estimular el paso de microfilarias de los tejidos a la sangre circulante.
- La toma de antimaláricos y de algunos antihelmínticos (albendazol y otros) podrían enmascarar el diagnóstico.

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.

Anexo I. Esquema de procesamiento para visualización de filarias en sangre

FILARIAS EN SANGRE
<ol style="list-style-type: none"> 1. Póngase guantes de látex. 2. Prepare el material necesario y ponga hojas adicionales de papel de filtro en la zona de trabajo. 3. Extraiga con una pipeta el total de sangre remitida y fuerce su paso a través de la membrana del filtro presionando suavemente. 4. Cargue la jeringa con 10 ml de agua destilada y páselos por el filtro tres veces. 5. Pase a través del filtro 3-4 ml de formol. Espere 5 minutos. 6. Pase por el filtro 10 ml de agua destilada para eliminar el exceso de formol. 7. Pase por el filtro 10 ml de aire para eliminar los restos del líquido. 8. Abra el contenedor del filtro, saque la membrana con unas pinzas y deposítela extendida en un portaobjetos. 9. Déjela secar completamente. 10. Fíjela con metanol al 100% durante unos cinco minutos 11. Deje secar el metanol. 12. Tiña con colorante Giemsa diluido 1/10 en tampón fosfato pH 7,2. 13. Toda la superficie de la membrana se debe examinar con el objetivo de 10x o 20x. Las imágenes sospechosas se examinarán a mayor aumento. 14. Anote los resultados 15. Descarte las muestras negativas examinadas, los portas y las pipetas Pasteur utilizadas en un contenedor adecuado. Limpie con lejía el recipiente de sujeción del filtro. Apague, limpie y cubra el microscopio. Limpie toda la zona de trabajo.

PNT-PI-06
PRUEBA DE MIGRACIÓN-CULTIVO DE LARVAS DE NEMATODOS

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

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital..... 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 de Microbiología..... Hospital.....	Prueba de migración-cultivo de larvas de nematodos	PNT-PI-06	
		Edición N° 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir el método de cultivo de larvas de nematodos intestinales: *Strongyloides stercoralis*, uncinarias (*Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*) y *Trichostrongylus* spp. La utilización del cultivo aumenta la sensibilidad en el diagnóstico de estas parasitosis.

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*.

El método de cultivo en placa de agar es el que ha demostrado una mayor sensibilidad.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Sánchez C (Coordinador), Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología nº 1 a, 2ª edición. SEIMC. 2003. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

- Loza E (Coordinador). Alomar P, Bernal A, Harto A, Pérez JL, Picazo JJ, Sarazá LL. Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica. Procedimientos en Microbiología nº 10, 1ª edición. SEIMC. 2000. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

- Manual de gestión de residuos del laboratorio.

- Atlas de parasitología del laboratorio.

4. MUESTRAS

4.1 VOLANTE DE PETICIÓN

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 visitados, 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

7. PROCESAMIENTO

- 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 gr 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.

Servicio de Microbiología..... Hospital.....	Prueba de migración-cultivo de larvas de nematodos	PNT-PI-06	
		Edición N° 01	Página 3 de 4

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 LOS RESULTADOS

Se pueden observar larvas de nematodos, de *Strongyloides stercoralis*, uncinarias (*Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*) o *Trichostrongylus* spp. Si hay larvas de *Strongyloides*, 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.

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 (transplante, 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 pueden ser utilizadas 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.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Garcia LS. Diagnostic Medical Parasitology. 5ª Edición, ASM Press Washington, D.C. 2007.

Servicio de Microbiología..... Hospital.....	Prueba de migración-cultivo de larvas de nematodos	PNT-PI-06	
		Edición N° 01	Página 4 de 4

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.