

Infecciones importadas en España: revisión del diagnóstico microbiológico

Javier Pardo-Lledías¹, Amaia Campo-Núñez¹, Inmaculada Galindo-Pérez², Virginia Velasco-Tirado³, Sara Argenta-Fernández⁴, Moncef Belhassen-García⁵

¹Servicio de Medicina Interna. Complejo Asistencial Universitario de Palencia. (CAUPA). Palencia. ²Centro de Atención Primaria José Barros. Camargo. Cantabria. ³Servicio de Dermatología. Complejo Asistencial Universitario de Salamanca (CAUSA). Instituto de investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL). Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS). Universidad de Salamanca. ⁴Servicio de Medicina Interna. CAUSA. Salamanca. ⁵Servicio de Medicina Interna. Sección de Enfermedades Infecciosas. CAUSA. IBSAL. CIETUS. Universidad de Salamanca. Salamanca.

Resumen

En España todavía son básicas para el diagnóstico de las infecciones importadas los métodos clásicos microbiológicos. Aunque presentan numerosas limitaciones estas técnicas tienen como ventajas su alta especificidad y disponibilidad. La aparición y consolidación de nuevas técnicas diagnósticas como el inmunodiagnóstico (que incluyen la detección de antígenos, anticuerpos y las reacciones inmunes complejas), el diagnóstico molecular que incluyen las técnicas de amplificación isotérmica como el LAMP y las plataformas de arrays de ADN (con posibilidad de detectar múltiples patógenos) están mejorando y cambiando el enfoque diagnóstico de estas infecciones. Aunque su manejo todavía no está bien establecido.

En resumen, la elección de una u otra prueba diagnóstica en este grupo de infecciones dependerá no sólo de la precisión de la prueba, sino también del objetivo diagnóstico (cribado o diagnóstico), gravedad de la enfermedad, disponibilidad, coste e incluso aceptabilidad por parte del paciente.

Palabras clave:

Diagnóstico. Infecciones importadas. España. Parásitos. Helmintiasis.

Imported infections in Spain: review of the microbiological diagnosis

Summary

Nowadays epidemiological history, clinical and classical methods of microbiological isolation are basic for the diagnosis of imported infectious diseases in Spain. High specificity and availability are the major advantages of the conventional techniques. The emergence and consolidation of new immunological and molecular techniques facilitate the diagnosis of these infections. Immunodiagnostic methods include detection of antigens, antibodies and complex immune reactions. The molecular diagnosis has a good overall sensitivity plus group and species high specificity, allowing more accurate diagnosis. There are currently being validated techniques such as LAMP (isothermal amplification), which is a cheap and simple method although limited for poor accessibility. Eventually DNA arrays platforms could be an invaluable aid in the diagnosis of this group of infections in the future. In short, the choice of diagnostic test in this group of infections depends not only on the accuracy of the test, but also the diagnosis target (screening or diagnosis), disease severity, availability, cost and even acceptability the patient.

Key words:

Diagnosis. Imported infections. Spain. Parasite. Helminth infection.

Correspondencia: Moncef Belhassen-García

E-mail: mbelhassen@hotmail.com

Introducción

El diagnóstico de una infección importada, como el diagnóstico de cualquier infección, es un proceso complejo que presenta tres fases bien diferenciadas. La primera y más importante es la elaboración de una hipótesis diagnóstica basada en la realización de:

- Una buena historia *epidemiológica* en la que no deben faltar la procedencia del individuo, el ámbito no sólo geográfico sino también social y sanitario, los factores de riesgo de exposición y en los viajeros las medidas de profilaxis previas al viaje (como la vacunación y quimioprofilaxis), durante el viaje (como el uso de mosquiteras, repelentes, seguridad en las conductas alimentarias o sexuales) y posteriores al viaje (mantenimiento de la quimioprofilaxis de la malaria).
- La recogida de las principales *manifestaciones clínicas*, los datos de exploración física más relevantes y los resultados de pruebas complementarias básicas.
- Finalmente en la *integración de los dos previos en función del conocimiento del clínico*.

En una segunda fase el clínico debe *solicitar una o más pruebas diagnósticas* y en función del resultado positivo o negativo finalmente aceptar o rechazar la sospecha diagnóstica inicial. En la clínica habitual, no es frecuente la obtención de diagnósticos de certeza absoluta y habitualmente los diagnósticos que manejamos son de mayor o menor probabilidad. En este sentido la interpretación de los resultados positivo y negativo (*Valor Predictivo Positivo* y *Valor Predictivo Negativo*) de un test, deben obligatoriamente realizarse (según el modelo Bayesiano) en función de la probabilidad de la hipótesis diagnóstica inicial (probabilidad pre-prueba).

La creciente aplicación de la tecnología con fines diagnósticos en las diferentes enfermedades infecciosas importadas nos permite actualmente disponer, junto a los métodos clásicos de aislamiento microbiológico, otros complementarios como el inmunodiagnóstico y el diagnóstico de ácidos nucleicos (diagnóstico molecular). La aparición reciente de plataformas de arrays de ADN^{1,2}, puede que en un futuro próximo se convierta en otra herramienta útil en el diagnóstico de ciertos síndromes frecuentes en patología importada como son la fiebre del viajero, las diarreas o las infecciones del sistema nervioso central (SNC).

La aplicación de los métodos moleculares como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y/o hibridación de ADN, y más recientemente otros proteómicos como la espectrometría de masas (MALDI-TOF), permite acelerar el diagnóstico definitivo de una forma totalmente específica y abarata los costes³.

Tabla 1. Factores que influyen en la elección de una prueba diagnóstica en infección importada.

Factores de elección de una prueba diagnóstica
<p>Factores dependientes de la enfermedad</p> <ul style="list-style-type: none"> Presentación clínica (cribado vs diagnóstico de enfermedad) Gravedad Diagnóstico diferencial con otras etiologías (no infecciosas) Microorganismo sospechado Fase de la infección (aguda vs subaguda o crónica) Complejidad del tratamiento empírico
<p>Factores dependientes de la prueba</p> <ul style="list-style-type: none"> Precisión en el diagnóstico Disponibilidad Coste
<p>Factores asociados al paciente</p> <ul style="list-style-type: none"> Viajero o inmigrante Grado de Inmunodepresión Aceptación a realizar las pruebas

De esta forma y teniendo en cuenta en el momento actual la posibilidad de emplear diferentes herramientas diagnósticas, un clínico debe de decidir qué pruebas solicitar a su paciente dependiendo de aspectos asociados a la propia *enfermedad* del paciente, factores concernientes a la *prueba* e incluso derivados del *propio paciente* (Tabla 1).

En el siguiente trabajo revisaremos de una forma global como se realizan en el momento actual el diagnóstico de las principales infecciones importadas en España, los diferentes métodos, las ventajas e inconvenientes en la práctica asistencial, centrándonos en los métodos disponibles en laboratorios de asistencia clínica.

Métodos clásicos de aislamiento microbiológico

Actualmente en España los métodos clásicos de aislamiento microbiológico siguen constituyendo la primera línea en el diagnóstico de la infección bacteriana importada siendo menos útiles en el diagnóstico parasitario y vírico importado.

El aislamiento del microorganismo permite no solo un diagnóstico grupo específico sino frecuentemente especie específica. Otra ventaja de estos métodos de aislamiento clásico son su coste relativamente bajo y que están disponibles en casi todos los centros sanitarios. La baja sensibilidad global es la mayor limitación de los métodos microbiológicos clásicos en

el manejo de la infección importada. Además, algunas infecciones no pueden ser diagnosticadas con medios de cultivos convencionales y precisan medios de cultivos solo accesibles en los laboratorios de referencia como las rickettsiosis, leptospirosis o las virosis importadas. Así mismo, algunos microorganismos no se pueden aislar en fase aguda de la enfermedad (pej. la esquistosomiasis) y otros en fase crónica (p.ej. enfermedad de Chagas). Asimismo, la sensibilidad viene condicionada por múltiples factores como: el tipo de muestra recogida, el número e incluso el momento de recogida de la muestra. En este sentido la sensibilidad diagnóstica de un test de Knott para *Loa-loa* mejora en horario diurno, mientras en el caso de *Wuchereria bancrofti* mejora en horario nocturno. También, el procesamiento de las muestras mediante el empleo de cultivos o la concentración de parásitos puede contribuir notablemente a una mejora de la sensibilidad diagnóstica.

En el aislamiento de una *infección viral* importada es preciso la realización de cultivos en diferentes líneas celulares que precisan laboratorios de bioseguridad de al menos nivel 3, por lo cual las técnicas de aislamiento microbiológico no tienen en el momento actual una clara utilidad clínica en el diagnóstico de infección viral importada en práctica asistencial (Tabla 2).

Para el diagnóstico de *infección bacteriana* importada (Tabla 3) los cultivos son claves en el diagnóstico en al menos tres de los síndromes más frecuentes del viajero: la *fiebre del viajero*, la *diarrea* y las *piodermitis*, en donde además del diagnóstico etiológico, podemos obtener un antibiograma, que permitirá un tratamiento dirigido de la infección. En cuanto al estudio de la fiebre del viajero, si excluimos los cuadros disenteriformes, las causas bacterianas piogénicas apenas constituyen el 2-5% en las series, siendo la más frecuente, la fiebre entérica (*Salmonella typhi* o *Salmonella paratyphi*)^{4,5}. Para la detección de *S. typhi* o *S. paratyphi* los cultivos bacterianos de aislamientos procedentes de biopsia/aspirado de medula ósea resultan más sensibles, que los obtenidos de sangre periférica, permitiendo además el diagnóstico, incluso en pacientes en tratamiento antibiótico empírico^{6,7}. A pesar de ello, su carácter invasivo, hace que no sea una técnica de rutina inicial. Así, en dos series recientes en nuestro país con 110 casos de fiebre entérica, un alto porcentaje de origen importado, un 90% del total de casos fueron diagnosticados mediante técnicas de hemocultivo convencional y el resto mediante coprocultivo en un contexto clínico compatible⁸.

Aislamientos en muestras cutáneas no sólo permiten el diagnóstico de las piodermitis en los viajeros si no también otras

Tabla 2. Principales infecciones virales importadas en España: utilidad de pruebas diagnósticas y frecuencia de casos importados.

	A. microbiológico	Inmunodiagnóstico	Diagnóstico molecular	Diagnóstico en España
V. Dengue Fiebre importada		Detección Ag/Ac (IFI,EIA, TDR)	Sg. primeros 10 días	++++
V. Chikungunya Fiebre importada		Detección Ag/Ac (IFI,EIA, TDR)	PCR Sg. primeros 10 días	+++
V. Fiebre amarilla Síndrome visceros y neurotrópico		Detección de Ac (IFI)	PCR Sg. primeros 10 días	-/+ (actualmente solo casos autóctonos viscerotrópicos post-vacunación)
V. Zika Fiebre importada		Detección Ac (IFI)	PCR Sg. primeros 10 días	+ (primeros casos 2016)
V. Ebola Fiebre importada			Sg. Primeros 17 días Semen meses.	+ (2 casos importados, primer caso autóctono 2015)
HTLV-1 Paraparesia espástica, linfoma		Detección Ac (EIA/InnoLIA)	PCR	Infección ++++ y Mielopatía +
VIH-2 SIDA		Detección Ac y Ac (EIA y Inmunoblot)	PCR tiempo real (carga viral) Seguimiento post tratamiento	+++

Muy útiles
 Utilidad media
 Poco útiles

Tabla 3. Principales infecciones bacterianas y fúngicas importadas en España: utilidad de pruebas diagnósticas y frecuencia de casos importados en España.

	A. microbiológico	Inmunodiagnóstico	Diagnóstico molecular	Frecuencia
<i>E. coli</i> (ECET y ECEA) Diarrea del viajero	Coprocultivo		PCR y HIS (Identificación cepas)	++++
<i>Shigella spp.</i> Disentería	Coprocultivo			++
<i>M. tuberculosis</i> Infección y enfermedad TBC	Baciloscopia y/o cultivo	TCT/QFT*** (inmigrantes mejor QFT*)		++++
<i>M. leprae</i> Lepra	Baciloscopia y/o biopsia		PCR no comerciales (paucibacilares)	++
<i>R. africae</i> Fiebre africana por garrapatas		IFI (<i>R. conori</i>)	Muestras cutáneas (pacientes tratados)	+++
<i>S. tify</i> Fiebre entérica	Hemocultivo (<heces y medula ósea)			+++
<i>Shewanella spp.</i> Pie patera	Cultivo cutáneo			+
Infecciones fúngicas				
<i>H. capsulatum</i> Histoplasmosis aguda y crónica	Biopsia/cultivo (solo para <i>H.</i> crónica inmigrantes)	Detección Ac I (Inmunodifusión) (mas útil <i>H.</i> agudas viajeros)	PCR (<i>H.</i> aguda y crónica)	+++
<i>P. braziliensis</i> Paracoccidiomicosis	Biopsia/cultivo (<i>H.</i> crónica)	Inmunodifusión (<i>P.</i> aguda y crónica)	PCR (<i>P.</i> aguda y crónica)	+
<i>Fosacea spp,</i> <i>Claophialophora spp,</i> Cromoblastomicosis	Biopsia/cultivo (infección crónica)		PCR Identificación especie	+
<i>Sporothrix schenkii</i> Esporotricosis				++

Muy útiles Utilidad media Poco útiles

E. coli enterotoxigénica (ECET) y *E. coli* enteroagregativa (ECEA).

infecciones mas infrecuentes como el pian (*Treponema pallidum* subespecie *pertenue*). Asimismo se pueden realizar tinciones en muestras cutáneas para la detección de *Mycobacterium leprae*^{9,10}.

En el diagnóstico de *infección fúngica profunda* importada sigue siendo útil el aislamiento microbiológico, cuyo procesamiento puede requerir medidas de bioseguridad tipo 3 (Tabla 3). Así, en un reciente trabajo en España realizado en pacientes con paracoccidio-

micosis e histoplasmosis importada, el aislamiento del hongo en diferentes muestras pudo diagnosticarse en los 6 (100%) pacientes que presentaban paracoccidiomicosis y en el 56% de los que presentaba histoplasmosis, con notable diferencias en el rendimiento entre los inmigrantes (con manifestaciones de una histoplasmosis crónica) con un 73% de (22/30) positividad frente a los viajeros (con cuadros de histoplasmosis aguda) con un 0% (0/9) de positividad¹¹.

También en el caso diagnóstico de *infección parasitaria* el aislamiento microbiológico sigue ocupando el primer escalón (Tabla 4). En cuanto a malaria, distintas sociedades y grupos de expertos siguen propugnando en el primer escalón de evaluación de pacientes con sospecha de malaria la realización de gota gruesa seguida de uno a tres frotis finos para la evaluación de especie y cuantificación de la parasitemia¹²⁻¹⁴. Una limitación de la gota gruesa y del frotis es que precisan tiempo y experiencia del observador en el diagnóstico de especie, especialmente en infecciones parasitarias mixtas. Además hay que destacar que entre un 10 y un 35% de todas las malaras importadas en España son submicroscópicas y no se diagnostican con métodos observación directa¹⁵⁻¹⁷. La probabilidad de la malaria submicroscópica es mayor en inmigrantes respecto a viajeros, y en pacientes asintomáticos con esplenomegalia y sin trombocitopenia^{12,14}.

El aislamiento de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* puede realizarse en fase aguda con hemocultivos en medios especiales o mediante visualización directa con micrométodo o gota gruesa¹⁸. Resulta especialmente útil en neonatos con riesgo de transmisión vertical por madres infectadas y en el Chagas autóctono, si bien ocasionalmente en pacientes con enfermedad de Chagas importada con reactivación asociada a situaciones de inmunosupresión es potencialmente posible la detección de *T. cruzi* en diferentes muestras¹⁹.

El análisis coproparasitario con estudio directo (tinción con lugol) y la concentración de huevos con formol-eter (test Ritchie) y/o con el Kato-katz, permite el diagnóstico de la mayor parte de los casos de protozoosis, helmintosis intestinales y amebiasis (*Entamoeba histolytica*). El rendimiento de estos test aumenta con la realización por triplicado en días distintos y con el empleo

Tabla 4. Principales infecciones parasitarias importadas en España: utilidad de pruebas diagnósticas y frecuencia de casos importados.

	A. microbiológico	Inmunodiagnóstico	Diagnóstico molecular	Frecuencia
<i>Trypanosoma cruzi</i> Enfermedad de Chagas		Detección Ac (EIA/IB)	Diagnóstico y seguimiento	++++
<i>Leishmania spp.</i> Cutánea, mucocutánea, visceral	Inspección y cultivo (Raspado/biopsia cutánea y médula)		PCR (Identificación especie)	+++
<i>Plasmodium spp.</i> Malaria	Gota gruesa y frotis (sangre total)		PCR múltiple	++++
<i>Entamoeba histolytica</i> Absceso amebiano* y disentería	Coproparasitario y abscesos hepáticos	Detección Ac (absceso amebiano) Detección Ag suero/heces		+++
<i>A. duodenale, T. trichuriae y otros</i> Geohelmintosis				++++
<i>Strongyloides stercoralis</i> Estrongiloidosis	Cultivo larvas	Detección Ac (EIA)		++++
<i>Taenia solium</i> Cisticercosis* y infección intestinal	Coproparasitario	Detección Ag (EIA y IB)		++
<i>S. mansoni y S. haematobium</i> Esquistosomiasis aguda y crónica	Kato-katz heces (S.m) centrifugación y filtración orina (S.h)	Detección Ac (EIA y HAI) en Katayama y S.cronica	PCR y LAMP Orina y heces	++++
<i>Wuchereria bancrofti</i> Filariasis linfática	Knott y filtración (sangre noche)	Ag (TDR)	PCR	+
<i>Loa-loa y Mansonella perstans</i> Filariasis de serosas	Knott y filtración (sangre día)		PCR (filariasis oculta e infecciones mixtas)	+++++
<i>Onchocerca volvulus</i> Oncocercosis cutánea y ocular	Pellizco cutáneo	Ac (EIA y TDR)		+ (actualidad)

*Exige además pruebas de imagen como ultrasonografía, tomografía computerizada o resonancia magnética.

Muy útiles
 Utilidad media
 Poco útiles

en paralelo de varias de estas técnicas^{20,21}. Una excepción al alto rendimiento de los análisis coproparasitarios es el *Strongyloides stercoralis*, cuyo diagnóstico precisa frecuentemente otros métodos de concentración basados en la migración larvaria en fase líquida como Baerman o sólida como el cultivo de larvas en placa agar o carbón activado (RequenaMendez²³). Un reciente meta análisis que compara todos los métodos de diagnóstico parasitológico directo estableció que el método más sensible era el de cultivo larvario en placa de agar con una sensibilidad próxima al 90%²². A pesar de esta alta sensibilidad sólo el 25-50% de casos diagnosticados en dos series de estrogiloidosis en España se pudo hacer mediante aislamiento microbiológico, precisando el resto de casos el inmunodiagnóstico^{23,24}.

En cuanto al aislamiento de *Schistosoma mansoni* la muestra por biopsia rectal presenta más sensibilidad que la de heces procesada mediante Kato-katz²⁵. A pesar de la utilidad de esta técnica, no se utiliza de forma generalizada por ser muy laboriosa. Igualmente la obtención de biopsia tras cistoscopia resulta más sensible que la concentración de huevos de *Schistosoma haematobium* en orina²⁶. Estas técnicas están reservadas para casos concretos en donde no se obtiene el diagnóstico mediante métodos no invasivos o en los pacientes en los que el diagnóstico diferencial abarca entidades graves como la enfermedad inflamatoria intestinal o la neoplasia vesical. Un hecho persistente en diferentes series de esquistosomiasis importada en España, no así en otras series de Europa²⁷, es la desproporción entre los numerosos casos diagnosticados de infección por *S. haematobium* frente a menor número de casos para *S. mansoni*²⁸⁻³¹. Dos razones pueden justificar esto: por una parte la sintomatología de la esquistosomiasis urinaria más característica que la intestinal permite probablemente sospechar un síndrome urinario y solicitar con más frecuencia test de concentración de huevos en orina que Kato-katz en heces. Por otra parte los inmigrantes y viajeros llegados a España proceden de áreas donde la infección *S. haematobium* es más prevalente que la de *S. mansoni*. Con todo ello menos de la mitad de casos de esquistosomiasis importada en España presentan un diagnóstico parasitológico definitivo siendo necesario frecuentemente la realización de métodos complementarios^{27,29,31}.

Para el aislamiento de filarías linfáticas y de serosas se realiza una concentración de microfilarías mediante el test de Knott y/o filtración de sangre con membrana de nucleopore, con muestras obtenidas en horario nocturno y diurno, respectivamente. El rendimiento del test de Knott en inmigrantes subsaharianos es homogéneo entre series nacionales y oscila del 5-9%, siendo mucho más frecuente la detección de *Mansonella perstans* que *Loa-loa*³²⁻³⁴. En cuanto a la infección por filarías linfáticas (*Wuchereria*

bancrofti o *Brugia spp.*) no existe hasta el momento ningún caso publicado en España con aislamiento microbiológico. A pesar del buen rendimiento del test de Knott, estudios en zona endémica de filarías y también estudios de infección importada en España, demuestran que la filarías oculta (con test microscópicos negativos) pueden doblar o incluso triplicar los casos de *Mansonella perstans* y *Loa-loa* respectivamente^{32,35}. En cuanto al diagnóstico de filarías cutánea por *Onchocerca volvulus*, el pellizco cutáneo y la lámpara de hendidura permiten el diagnóstico de microfilarías en piel y cámara anterior del ojo. La mayor limitación en el pellizco cutáneo deriva de que es una prueba molesta y que su sensibilidad depende del número de muestras y la realización es difícilmente aceptado por todos los pacientes, especialmente cuando se utiliza en cribado en pacientes asintomáticos^{36,37}. Además en los últimos años debido al control vectorial y sobre todo a las campañas masivas con ivermectina han supuesto una reducción notable de la oncocercosis en población de origen³⁸ y secundariamente del número de casos importados en España, con lo que el diagnóstico final de esta infección se ha reducido de manera significativa³⁰. En un estudio reciente sólo 1 de 52 (1,9%) menores subsaharianos con sintomatología cutánea tenían un pellizco cutáneo positivo³⁹.

Métodos de inmunodiagnóstico

Los test de inmunodiagnóstico (ID) presentan de forma global una sensibilidad muy superior a los métodos de aislamiento microbiológico. Pueden servir para el diagnóstico de infección en diferentes fases de la infección y en el diagnóstico de microorganismos que precisan cultivos no disponibles en los laboratorios clínicos. Su mayor limitación son su baja especificidad, no obstante esta menor especificidad de especie, puede ser en ocasiones ventajosa. Además la creciente utilización de antígenos purificados y recombinantes y de anticuerpos monoclonales, han mejorado notablemente su especificidad. En los últimos años con su progresiva comercialización su disponibilidad ha mejorado notablemente. La introducción de test rápidos basados en inmunocromatografía han permitido simplificar el método y no requieren una formación específica del personal de laboratorio para su realización e interpretación.

Detección de anticuerpos

Múltiples pruebas de detección de anticuerpos, basados en enzima-inmunoanálisis (EIA), inmunoblot (IB), inmunofluorescencia indirecta (IFI), hemaglutinación (HAI) y otros, son utilizados en la detección de patógenos causantes de infección importada.

Muchas de estas técnicas no se realizan en todos los laboratorios de microbiología por volumen de muestras y falta de experiencia y son realizadas en laboratorios de referencia con amplia experiencia en estas pruebas y su interpretación.

Los métodos de ID para detección de anticuerpos permiten el diagnóstico de infección aguda mediante la detección de IgM a títulos elevados, no obstante la sensibilidad de esta es baja por lo que es frecuente que el diagnóstico deba esperar 4-6 semanas en la fase de convalecencia clínica, para detectar la seroconversión. El diagnóstico de infección crónica esta basado en detección de IgG o subtipos de esta, frente a los diferentes microorganismos. Sin embargo el diagnóstico serológico de estas enfermedades no permite diferenciar claramente en pacientes paucisintomáticos entre aquellos que presentan una infección activa o una infección pasada, por lo que tampoco resultan globalmente de interés en el control postratamiento.

Los test de inmunodiagnóstico constituyen hoy por hoy todavía el patrón oro para el diagnóstico de 4 de las infecciones cosmopolitas mas importantes en inmigrantes y viajeros como son la infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus hepatitis A (VHA), virus hepatitis B (VHB), virus hepatitis C (VHC)^{40,41}.

La sensibilidad de los diversos test para la detección de infecciones virales como el dengue agudo han sido revisadas recientemente y en un análisis describen una sensibilidad que oscila entre el 75%-82%^{42,43}. Así, una serie colaborativa de casos en España con dengue, 35 de 65 casos totales fueron diagnosticados exclusivamente mediante detección de anticuerpos⁴⁴. Mas recientemente en un trabajo de 34 casos importados en el área metropolitana de Barcelona fueron todos diagnosticados mediante serología⁴⁵. En la infección por virus de *Chikungunya* también la IgM puede mostrar una baja sensibilidad inicial por lo que muchos diagnósticos finales precisan de tiempo para poder detectar seroconversión. No obstante la utilidad de la serología más habitual (IFI IgM/IgG Euroimmun G) queda avalada en varias series Españolas siendo positiva en 34 de los 43 pacientes reportados en tres series de casos importados^{42,45-47}. Otras infecciones emergentes como las causadas por el virus Zika, virus West Nile etc, con cuadros clínicos inespecíficos deberían realizarse estudios de neutralización para mejorar la especificidad de estos test dada las reacciones cruzadas entre virus de las mismas familias.

En la infección bacteriana las técnicas de inmunodiagnóstico tienen especial interés para el diagnóstico de patógenos que precisan cultivos especiales no disponibles fuera de laboratorios de referencia (como ejemplo las fiebres rickettsiales, leptospirosis, borreliosis etc). Así en el diagnóstico de la fiebre africana por garrapatas (*Rickettsia africae*) hoy por hoy la rickettsiosis importada

mas frecuente en España, la IFI para *Rickettsia conorii*, suele ser la técnica mas frecuente empleada con una sensibilidad para la IgM del 70% después de la tercera semana postinfección. La sensibilidad IFI IgG es muy alta aunque hay falsos negativos por tratamiento con doxiciclina en fase precoz de la enfermedad⁴⁸. El diagnóstico de otras infecciones importadas como la leptospirosis puede también realizarse mediante detección de anticuerpos como la microaglutinación⁴⁹.

En el diagnóstico de las micosis importadas, la detección de anticuerpos mediante inmunodifusión resulta un test útil especialmente en el diagnóstico de histoplasmosis aguda en viajeros con sensibilidad mucho mayor que en el diagnóstico de infección crónica en inmigrantes (100% frente a 40%). En el caso de infección por *Paracoccidioides braziliensis* los 6 inmigrantes con infección crónica diagnosticados en el Instituto de Salud Carlos III por aislamiento presentaron también una prueba de inmunodifusión positiva¹².

El diagnóstico de infección por *T. cruzi* causante de la enfermedad de Chagas se realiza también con detección de anticuerpos. La sensibilidad varía en relación a los diferentes métodos y antígenos empleados. Probablemente el EIA es el método con mayor sensibilidad próxima al 100%. No obstante dados los frecuentes falsos positivos se requiere la realización de otros test con diferente metodología o diferente antígeno preferiblemente, un inmunoblot. Sin embargo un resultado negativo es definitivo en la exclusión de la infección⁵⁰. Recientemente, la detección de anticuerpos mediante técnicas de quimioluminiscencia (CLIA) han mejorado la sensibilidad respecto a otros métodos.

En el diagnóstico de infección helmíntica importada la detección de anticuerpos permite el diagnóstico de estrongiloidiasis. Un reciente estudio multicéntrico en el que participó un grupo español valoró de forma externa varios test de ID demostrando una altísima sensibilidad y especificidad de los dos EIA comercializados (área sobre la curva ROC superior al 0,98)⁵¹. La utilidad de estos test se ve refrendada en varias series de casos importados en los que entre el 20 y el 50% de todos los casos de estrongiloidiasis importada fueron realizados exclusivamente mediante detección de anticuerpos^{25,26}.

En cuanto al diagnóstico de esquistosomiasis un estudio reciente evaluó la precisión diagnóstica de los test comercializados presentando una baja sensibilidad global que dependiendo del test se situaba entre 40-75%, siendo mayor para *S. mansoni* frente a *S. hematobium*⁵². Estos datos están muy alejados de los resultados de EIA no comercializados ("caseros") tanto con antígenos completos⁵³ como purificados⁵⁴. Datos de series en España, demuestran no obstante su utilidad en el diagnóstico de pacientes en infección aguda (fiebre de Katayama) como en

fase crónica³¹. Además, la aplicación de enzimoimmunoanálisis (EIA) con antígenos de *S. mansoni*, permiten el diagnóstico de otras especies como *S. haematobium* o *Schistosoma intercalatum*.

Para el diagnóstico de oncocercosis se utiliza un test de diagnóstico rápido que presenta una buena sensibilidad y especificidad y que permite evitar la realización de una prueba molesta como es el pellizco cutáneo⁵⁵.

En el caso de otras infecciones parasitarias más infrecuentes como la infección por *Gnathostoma spp.* o *Angiostrongylus spp.*, la serología permite el diagnóstico en ocasiones aunque no está disponible fácilmente y es preciso remitir las muestras a laboratorios especializados como los de los CDC de Atlanta (USA) o los de la Universidad de Mahidol en Bangkok (Tailandia) (<http://www.tm.mahidol.ac.th/en/special>)⁵⁶⁻⁵⁸.

Test de diagnóstico rápido (TDR)

Los llamados TDR son sistemas inmunodiagnóstico cuyo principio es la detección de antígenos microbianos, anticuerpos o ambos mediante técnicas inmunocromatográficas. En estos últimos años su desarrollo en la microbiología clínica ha sido enorme, y se aplican en todo tipo de muestras: respiratorias, sangre, suero, orina, líquido cefalorraquídeo y otras, y para la detección de multitud de patógenos diferentes. Son pruebas con buena sensibilidad y especificidad aunque algo menores que sus comparativas (por ejemplo EIA indirectos o los EIA de captura), pero su ventaja radica en que no precisan de metodología compleja ni experiencia en su aplicación por lo que pueden ser utilizados a "pie de paciente" en lugares con escasa infraestructura. Además son muy rápidos (se pueden obtener un resultado en unos minutos), lo que les convierte en pruebas de gran utilidad en síndromes clínicos graves como la fiebre del viajero. Para la infección importada se dispone en la actualidad de un número creciente de test. Así, en el diagnóstico de dengue se dispone de test rápidos comercializados que detectan simultáneamente antígenos (proteína NS1) y anticuerpos (IgM e IgG frente a esta misma proteína) y que permiten el diagnóstico desde el primer día de la infección, con alta concordancia con la PCR⁵⁹.

Para diagnóstico de malaria en el momento actual existen al menos 8 comercializados. Presentan diferencias en cuanto a número de bandas o proteínas antigénicas detectadas (2-4), siendo su sensibilidad mas alta para *Plasmodium falciparum* y menor para *Plasmodium vivax* y todavía inferior para el resto de especies. Además tienen problemas de sensibilidad en situaciones de baja y alta parasitemia (por fenómenos de prozona) y en el caso de

TDR basados en la detección de HRP-II de *P. falciparum* en sujetos infectados por *P. falciparum* con delección de este gen. Además presentan el problema que no permiten estimar la intensidad de la parasitemia de *P. falciparum* y que no permiten en general evaluar la respuesta al tratamiento¹⁴.

En cuanto al diagnóstico de filariasis linfáticas el clásico Binax-NOW® Filariasis se está sustituyendo por otro Alere Filariasis Strip® con idéntica precisión diagnóstica. Como hemos comentado previamente esta comercializado un TDR para el diagnóstico de infección por *O. volvulus* que permite la detección de IgG4 frente a la proteína recombinante Ov¹⁶, con una sensibilidad del 90% y una con especificidad superior al 95%⁵⁵.

Test inmunes

Por ultimo, las pruebas de inmunodiagnóstico (ID) incluyen las reacciones inmunológicas como el test cutáneo de la tuberculina (TCT) o el test de Mazzotti.

El TCT y la detección mediante el ensayo de liberación de interferón- γ (IGRA), constituyen el patrón oro en el diagnóstico de infección tuberculosa latente, y sus resultados tienen una alta concordancia. Diferentes estudios, demuestran un mayor riesgo de positividad en pacientes vacunados, un hecho muy habitual en inmigrantes de países en desarrollo⁶⁰. En este grupo de pacientes un test cutáneo de la tuberculina positivo entre 5-10 mm es frecuente, y la realización de un IGRA permitiría evitar el tratamiento de la tuberculosis latente hasta en un 30-50% de todos los posibles candidatos, aprovechando la ventaja de que los IGRAs en pacientes vacunados no son positivos⁶¹.

El test de histoplasmina se ha utilizado para el diagnóstico de *Histoplasma capsulatum* en viajeros. Sin embargo, este test ha sido abandonado en el momento actual para el diagnóstico de infección en el viajero, sustituido por otras técnicas de inmunodiagnóstico y diagnóstico molecular con mejor sensibilidad y especificidad.

El test de Mazzotti consiste en la administración de 50 mg de dietilcarbamacina por vía oral que induce la parálisis de las microfilarias de *O. volvulus* con un incremento del prurito. La precisión del test sin embargo no está bien validada. Además, antes de la administración de dietilcarbamacina es obligatorio descartar la infección por *Loa-loa* y de *O. volvulus* en la cámara anterior del ojo. El patch test consiste en una forma local de reacción de Mazzotti con la aplicación de crema dietilcarbamacina al 10% con posterior oclusión, con una sensibilidad del 64-80% y con especificidad del 80-92%⁶². Este test evita las reacciones graves aunque su falta de comercialización y estandarización parecen sus mayores limitaciones.

Métodos moleculares (detección de ácidos nucleicos)

La mayor parte de los test de detección de ácidos nucleicos están basados en la amplificación mediante PCR en sus diferentes modalidades (PCR clásica, PCR multiplex o PCR a tiempo real). Son test que presentan una alta sensibilidad y especificidad de grupo y de especie. La aplicación de PCR multiplex permite detectar simultáneamente múltiples dianas y la realización de PCR a tiempo real permite cuantificar la carga microbiana que frecuentemente se relaciona con la severidad de la infección.

Su mayor limitación es su complejidad y coste, limitando su ámbito a laboratorios de referencia y de investigación por lo que su disponibilidad es hoy por hoy reducida. Recientemente se están probando sistemas de amplificación isotérmica (como el LAMP) que permiten realizar las fases de amplificación en un baño isotérmico simplificando equipamiento y por tanto la complejidad y coste de las PCR clásicas. La detección del *amplicor* o fragmento amplificado puede realizarse en un gel convencional de agarosa o bien por "hidrólisis de pirofosfatos" mediante técnicas colorimétricas. Esto puede permitir aumentar la disponibilidad de estos test en centros con menor infraestructura^{4,63-65}.

En la infección importada, la utilidad clínica de las técnicas moleculares, más allá de la aplicación en aislamientos de microorganismos para un diagnóstico específico, radica en la detección de patógenos en muestras biológicas de una manera rápida y específica. Así la PCR constituye un método ideal para el diagnóstico de virosis importadas en una fase precoz (<10 días postinfección). En una serie colaborativa de casos importados de dengue en España el 42% fue diagnosticado mediante RT-PCR⁴⁴. El diagnóstico se realiza de forma similar, con otras virosis importadas en España como el virus de Chikungunya^{46,47}. El brote reciente de virus Ébola en el oeste de África ha supuesto la rápida aparición y aprobación por la FDA de múltiples plataformas de diagnóstico molecular que permiten la detección de virus durante toda la fase de enfermedad llegando a detectar incluso más allá de 14 semanas postinfección (FDA <http://www.fda.gov/EmergencyPreparedness/Counterterrorism>).

Para la infección por micosis importadas, la RT-PCR aplicada sobre diferentes muestras (respiratorias, médula ósea, biopsias, suero, etc.) aumenta la sensibilidad diagnóstica frente a *Histoplasma spp.*, y permite el diagnóstico del 55% viajeros con histoplasmosis aguda y el 89% de inmigrantes. Respecto a la infección por *Paracoccidioides spp.* la sensibilidad en diferentes muestras alcanza el 100%¹².

En la infección parasitaria la PCR múltiple en sangre para el diagnóstico de malaria permite el diagnóstico de infección con

una sensibilidad superior al frotis fino, gota gruesa o a los TDR, constituye actualmente el patrón oro de la infección, permitiendo además detectar casos de malaria submicroscópica o infecciones parasitarias mixtas¹⁶⁻¹⁸.

En cuanto a la PCR en el diagnóstico de Chagas importado, múltiples plataformas están comercializadas que detectan el kineplasto-ADN o satélite-ADN, con una buena sensibilidad y especificidad (83,3-94,4% y 85-95%, respectivamente)⁶⁶. Además resulta el método más útil para el control del tratamiento⁶⁷ y permite el diagnóstico de casos importados de reactivación post-inmunosupresión.

En el diagnóstico de filariosis linfáticas y de serosas la realización de una PCR en muestras de sangre demostró utilidad en la detección de infección oculta, y el diagnóstico de infecciones parasitarias mixtas. Sin embargo, su aplicación en más de 500 muestras no permitió el diagnóstico de un solo caso de infección por *Wuchereria spp*³⁶.

Por último, la comercialización de plataformas de *arrays* de ADN como FilmArray Biofire-diagnóstico⁶⁸, con posibilidad de detectar en menos de una hora múltiples patógenos son una realidad, que en función del coste, puede ayudar de forma inestimable al diagnóstico de la patología importada en los próximos años.

En conclusión, en este grupo de infecciones la técnicas diagnósticas disponibles están en crecimiento y es necesario conocerlas para un mejor rendimiento. La elección entre las diferentes pruebas depende de multitud de variables no sólo de la precisión de la prueba, si no también del objetivo diagnóstico (cribado o diagnóstico), gravedad de la enfermedad, disponibilidad, coste e incluso aceptabilidad por parte del paciente.

Abreviaturas

PCR reacción en cadena de la polimerasa; ADN Ácido desoxirribonucleico; EIA enzima-inmunoanálisis; IB inmunoblot; IFI inmunofluorescencia indirecta; HAI hemaglutinación; ID inmunodiagnóstico; TCT test cutáneo de la tuberculina; TDR test de diagnóstico rápido (inmunocromatografía); FDA *Food and Drug Administration*. LAMP *Loop-mediated isothermal amplification* (amplificación isoterma de ácidos nucleicos).

Bibliografía

1. Goterris L, Bocanegra C, Serre-Delcor N, Moure Z, Treviño B, Zazueta F, et al. [Screening of parasitic diseases in the asymptomatic immigrant population]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2016;34 Suppl 3:25-31.
2. Miller MB, Tang Y-W. Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology. *American Society for Microbiology. Clinical Microbiology Reviews*. 2009;22(4):611-33.

3. Buss SN, Leber A, Chapin K, Fey PD, Bankowski MJ, Jones MK, *et al*. Multicenter evaluation of the BioFire FilmArray gastrointestinal panel for etiologic diagnosis of infectious gastroenteritis. Burnham CAD, editor. American Society for Microbiology; *Journal of clinical microbiology*. 2015;53(3):915-25.
4. Niemz A, Ferguson TM, Boyle DS. Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases. *Trends Biotechnol*. 2011;29(5):240-50.
5. Wilson ME, Weld LH, Boggild A, Keystone JS, Kain KC, Sonnenburg von F, *et al*. Fever in returned travelers: results from the GeoSentinel Surveillance Network. *Clinical infectious diseases*. 2007;44(12):1560-8.
6. O'Brien D, Tobin S, Brown GV, Torresi J. Fever in returned travelers: review of hospital admissions for a 3-year period. *Clinical infectious diseases*. 2001;33(5):603-9.
7. Gilman RH, Termino M, Levine MM, Hernandez-Mendoza P, Hornick RB. Relative efficacy of blood, urine, rectal swab, bone-marrow, and rose-spot cultures for recovery of *Salmonella typhi* in typhoid fever. *Lancet*. 1975;1(7918):1211-3.
8. Parry CM, Wijedoru L, Arjyal A, Baker S. The utility of diagnostic tests for enteric fever in endemic locations. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2011;9(6):711-25.
9. Cabello A, Bayona JF, Fernández-Roblas R, Fernández-Guerrero M, Ramos JM, de Górgolas M. Enteric fever in Madrid. A review of the last 30 years. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2013;31(5):313-5.
10. Gomez-Moyano E, Crespo-Erchiga A, Sanz-Trelles A, Vera-Casaño A, Fajardo FS, Iglesia JMR, *et al*. Large infiltrated erythematous and scaly plaque on the cheek and thickened earlobe. *Clinical infectious diseases*. 2010;50(7):1015-6-1068-9.
11. Wyplosz B, Mihaila-Amrouche L, Baixench M-T, Bigel M-L, Berardi-Grassias L, Fontaine C, *et al*. Imported tickborne relapsing fever, France. *Emerging Infectious Diseases*. 2005;11(11):1801-3.
12. Buitrago MJ, Bernal-Martínez L, Castelli MV, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Histoplasmosis and paracoccidioidomycosis in a non-endemic area: a review of cases and diagnosis. *Journal of Travel Medicine*. 2011;18(1):26-33.
13. Muñoz J, Rojo-Marcos G, Ramírez-Olivencia G, Salas-Coronas J, Treviño B, Pérez-Arellano J-L, *et al*. [Diagnosis and treatment of imported malaria in Spain: Recommendations from the Malaria Working Group of the Spanish Society of Tropical Medicine and International Health (SEM-TSI)]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2015;33(6):e1-e13.
14. Torrús D, Carranza C, Manuel Ramos J, Carlos Rodríguez J, Rubio JM, Subirats M, *et al*. [Microbiological diagnosis of imported malaria]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2015;33 Suppl 2:40-6.
15. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, Richter SS, Gilligan PH, Thomson RB, *et al*. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM)(a). Vol. 57, *Clinical infectious diseases* 2013(57)e22-e121.
16. Rubio JM, Benito A, Berzosa PJ, Roche J, Puente S, Subirats M, *et al*. Usefulness of seminested multiplex PCR in surveillance of imported malaria in Spain. *Journal of clinical microbiology*. 1999;37(10):3260-4.
17. Iglesias N, Subirats M, Trevisi P, Ramírez-Olivencia G, Castán P, Puente S, *et al*. Performance of a new gelled nested PCR test for the diagnosis of imported malaria: comparison with microscopy, rapid diagnostic test, and real-time PCR. *Parasitology Research*. 2014;113(7):2587-91.
18. Ramírez-Olivencia G, Rubio JM, Rivas P, Subirats M, Herrero MD, Lago M, *et al*. Imported submicroscopic malaria in Madrid. *Malaria journal*. 2012;11(1):324.
19. Bern C. Chagas' Disease. *The New England journal of medicine*. 2015;373(5):456-66.
20. Verdú J, De Paz F, Castaño V, Torrús D, Reus S. Reactivation of Chagas disease with central nervous system involvement: peripheral blood smear evidence. *Int J Infect Dis*. 2009;13(6):e527-8.
21. Cartwright CP. Utility of multiple-stool-specimen ova and parasite examinations in a high-prevalence setting. *Journal of clinical microbiology*. 1999;37(8):2408-11.
22. Martín Sánchez AM, Hernández García A, González Fernández M, Afonso Rodríguez O, Hernández Cabrera M, Pérez-Arellano JL. [Intestinal parasitosis in the asymptomatic Sub-Saharan immigrant population. Gran Canaria 2000]. *Revista clínica española*. 2004;204(1):14-7.
23. Requena-Mendez A, Chiodini P, Bisoffi Z, Buonfrate D, Gotuzzo E, Muñoz J. The laboratory diagnosis and follow up of strongyloidiasis: a systematic review. Bottazzi ME, editor. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2013;7(1):e2002.
24. Campo Polanco L, Gutiérrez LA, Cardona Arias J. [Diagnosis of *Strongyloides Stercoralis* infection: meta-analysis on evaluation of conventional parasitological methods (1980-2013)]. *Revista española de salud pública*. 2014;88(5):581-600.
25. Cabezas-Fernández MT, Salas-Coronas J, Lozano-Serrano AB, Vázquez-Villegas J, Cabeza-Barrera MI, Cobo F. Strongyloidiasis in immigrants in Southern Spain. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2015;33(1):37-9.
26. Valerio L, Roue S, Fernández-Rivas G, Basile L, Martínez-Cuevas O, Ballesteros Á-L, *et al*. *Strongyloides stercoralis*, the hidden worm. Epidemiological and clinical characteristics of 70 cases diagnosed in the North Metropolitan Area of Barcelona, Spain, 2003-2012. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2013;107(8):465-70.
27. Abdel-Hafez MA, Bolbol AH. Fibre-optic sigmoidoscopy compared with the Kato technique in diagnosis and evaluation of the intensity of *Schistosoma mansoni* infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1992;86(6):641-3.
28. Patil KP, Ibrahim AI, Shetty SD, Tahir el MI, Anandan N. Specific investigations in chronic urinary bilharziasis. *Urology*. 1992;40(2):117-9.
29. Grobusch MP, Mühlberger N, Jelinek T, Bisoffi Z, Corachán M, Harms G, *et al*. Imported schistosomiasis in Europe: sentinel surveillance data from TropNetEurop. *Journal of Travel Medicine*. 2003;10(3):164-9.
30. Roca C, Balanzó X, Gascón J, Fernández-Roue JL, Vinuesa T, Valls ME, *et al*. Comparative, clinico-epidemiologic study of *Schistosoma mansoni* infections in travellers and immigrants in Spain. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 2002;21(3):219-23.
31. Pardo J, Arellano JLP, López-Vélez R, Carranza C, Cordero M, Muro A. Application of an ELISA test using *Schistosoma bovis* adult worm antigens in travellers and immigrants from a schistosomiasis endemic area and its correlation with clinical findings. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 2007;39(5):435-40.

32. Norman FF, Pérez de Ayala A, Pérez-Molina J-A, Monge-Maillou B, Zamarrón P, López-Vélez R. Neglected tropical diseases outside the tropics. Lyke KE, editor. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2010;4(7):e762.
33. Cobo F, Salas-Coronas J, Cabezas-Fernández MT, Vázquez-Villegas J, Cabeza-Barrera MI, Soriano-Pérez MJ. Infectious Diseases in Immigrant Population Related to the Time of Residence in Spain. *Journal of immigrant and minority health*. 2016;18(1):8-15.
34. Cobo F, Cabezas-Fernández MT, Salas-Coronas J, Cabeza-Barrera MI, Vázquez-Villegas J, Soriano-Pérez MJ. Filariasis in Sub-Saharan Immigrants Attended in a Health Area of Southern Spain: Clinical and Epidemiological Findings. *Journal of immigrant and minority health*. 2013.
35. Belhassen Garcia M, Pardo-Lledias J, Pérez Del Villar L, Muro A, Velasco-Tirado V, Muñoz Bellido JL, et al. Should parasitic disease be investigated in immigrant children with relative eosinophilia from tropical and sub-tropical regions? *Paediatr Int Child Health*. 2016:1-4.
36. Jiménez M, González LM, Bailo B, Blanco A, García L, Pérez-González F, et al. Differential diagnosis of imported filariasis by molecular techniques (2006-2009). *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*. 2011;29(9):666-71.
37. Touré FS, Mavoungou E, Kassambara L, Williams T, Wahl G, Millet P, et al. Human occult loiasis: field evaluation of a nested polymerase chain reaction assay for the detection of occult infection. *Tropical medicine & international health*. 1998;3(6):505-11.
38. Krotneva SP, Coffeng LE, Noma M, Zouré HGM, Bakoné L, Amazigo UV, et al. African Program for Onchocerciasis Control 1995-2010: Impact of Annual Ivermectin Mass Treatment on Off-Target Infectious Diseases. Steinmann P, editor. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2015;9(9):e0004051.
39. Belhassen Garcia M, Pardo-Lledias J, Pérez Del Villar L, Muro A, Velasco-Tirado V, Blázquez de Castro A, et al. Relevance of Eosinophilia and Hyper-IgE in Immigrant Children. *Medicine*. 2014;93(6):e43.
40. Belhassen García M, Perez Del Villar L, Pardo-Lledias J, Gutiérrez Zufiaurre MN, Velasco Tirado V, Cordero-Sánchez M, et al. Imported transmissible diseases in minors coming to Spain from low-income areas. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(4):370.e5-8.
41. López-Vélez R, Huerga H, Turrientes MC. Infectious diseases in immigrants from the perspective of a tropical medicine referral unit. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2003;69(1):115-21.
42. Domingo C, Alves MJ, de Ory F, Teichmann A, Schmitz H, Müller R, et al. International external quality control assessment for the serological diagnosis of dengue infections. *BMC Infectious Diseases*. 2015;15(1):167.
43. Negredo Antón AI, de Ory Manchón F, Sánchez-Seco Fariñas MP, Franco Narváez L, Gegúndez Cámara MI, Navarro Mari JM, et al. Microbiological diagnosis of emerging arboviral and rodent borne diseases. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*. 2015; 33(3):197-205.
44. Muñoz J, Puente S, López-Vélez R, Domingo C, Ruiz J, Ramírez G, et al. Clinical and epidemiological features of imported dengue in Spain. *Medicina clínica*. 2008;131(1):18-21.
45. Valerio L, Roure S, Fernández-Rivas G, Ballesteros Á-L, Ruiz J, Moreno N, et al. Arboviral infections diagnosed in a European area colonized by *Aedes albopictus* (2009-2013, Catalonia, Spain). *Travel medicine and infectious disease*. 2015;13(5):415-21.
46. Sánchez-Seco MP, Negredo AI, Puente S, Pinazo MAJ, Shuffenecker I, Tenorio A, et al. Microbiological diagnosis of chikungunya virus in Spain (2006-2007): case detection in travelers. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*. 2009;27(8):457-61.
47. Requena-Méndez A, Garcia C, Aldasoro E, Vicente JA, Martínez MJ, Pérez-Molina JA, et al. Cases of chikungunya virus infection in travellers returning to Spain from Haiti or Dominican Republic, April-June 2014. Euro surveillance: bulletin européen sur les maladies transmissibles. *European communicable disease bulletin*. 2014;19(28):20853.
48. Fournier P-E, Jensenius M, Laferl H, Vene S, Raoult D. Kinetics of antibody responses in *Rickettsia africae* and *Rickettsia conorii* infections. Clinical and diagnostic laboratory immunology. *American Society for Microbiology* 2002;9(2):324-8.
49. Calvo-Cano A, Aldasoro E, Ramirez M, Martinez M, Requena-Méndez A, Gascón J. Two cases of laboratory-confirmed leptospirosis in travellers returning to Spain from Thailand, September 2013. Euro surveillance: bulletin européen sur les maladies transmissibles, *European communicable disease bulletin*. 2014;19(2).
50. Gascon J, Grupo de Trabajo del Taller Enfermedad de Chagas Importada: Un Nuevo Reto de Salud Pública? *Diagnosis and treatment of imported Chagas disease*. 2005. pp. 230-5.
51. Bisoffi Z, Buonfrate D, Sequi M, Mejia R, Cimino RO, Krolewiecki AJ, et al. Diagnostic accuracy of five serologic tests for *Strongyloides stercoralis* infection. Siddiqui AA, editor. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2014;8(1):e2640.
52. Kinkel H-F, Dittrich S, Bäumer B, Weitzel T. Evaluation of eight serological tests for diagnosis of imported schistosomiasis. *Clin Vaccine Immunol*. 2012;19(6):948-53.
53. Pardo J, Carranza C, Turrientes MC, Pérez-Arellano JL, López-Vélez R, Ramajo V, et al. Utility of *Schistosoma bovis* adult worm antigens for diagnosis of human schistosomiasis by enzyme-linked immunosorbent assay and electroimmunotransfer blot techniques. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2004;11(6):1165-70.
54. Al-Sherbiny MM, Osman AM, Hancock K, Deelder AM, Tsang VC. Application of immunodiagnostic assays: detection of antibodies and circulating antigens in human schistosomiasis and correlation with clinical findings. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1999;60(6):960-6.
55. Weil GJ, Steel C, Liftis F, Li BW, Mearns G, Lobos E, et al. A rapid-format antibody card test for diagnosis of onchocerciasis. *The Journal of infectious diseases*. 2000;182(6):1796-9.
56. Godoy-Gijón E, Belhassen Garcia M, Santos-Briz A, Cordero-Sánchez M. Migrating skin lesions in a Thai patient. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*. 2012;30(8):479-80.
57. de Górgolas Hernández-Mora M, Fernández-Guerrero ML. Gnathostomiasis: an increasing disease among travellers. *Medicina clínica*. 2005;125(5):190-2.
58. Puente S, Gárate T, Grobusch MP, Janitschke K, Bru F, Rodríguez M, et al. Two cases of imported gnathostomiasis in Spanish women. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 2002;21(8):617-20.
59. Wang SM, Sekaran SD. Early diagnosis of Dengue infection using a commercial Dengue Duo rapid test kit for the detection of NS1,

- IGM, and IGG. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2010;83(3):690-5.
60. Salinas C, Ballaz A, Díez R, Aguirre U, Antón A, Altube L. Tuberculosis screening program for undocumented immigrant teenagers using the QuantiFERON(®)-TB Gold In-Tube test. *Medicina clínica*. 2015;145(1):7-13.
 61. Painter JA, Graviss EA, Hai HH, Nhung DTC, Nga TTT, Ha NP, *et al*. Tuberculosis screening by tuberculosis skin test or QuantiFERON-TB Gold In-Tube Assay among an immigrant population with a high prevalence of tuberculosis and BCG vaccination. Herrmann JL, editor. *PLoS one*. 2013;8(12):e82727.
 62. Ozoh G, Boussinesq M, Bissek A-CZ-K, Kobangue L, Kombila M, Mbina J-RM, *et al*. Evaluation of the diethylcarbamazine patch to evaluate onchocerciasis endemicity in Central Africa. *Tropical medicine & international health*. 2007;12(1):123-9.
 63. Fernández-Soto P, Mvoulouga PO, Akue JP, Abán JL, Santiago BV, Sánchez MC, *et al*. Development of a highly sensitive loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for the detection of Loa loa. Xu S-Y, editor. *PLoS one*. 2014;9(4):e94664.
 64. Gandasegui J, Fernández-Soto P, Carranza Rodríguez C, Pérez-Arellano J-L, Vicente B, López-Abán J, *et al*. The Rapid-Heat LAMPellet Method: A Potential Diagnostic Method for Human Urogenital Schistosomiasis. Bethony JM, editor. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2015;9(7):e0003963.
 65. Fernández-Soto P, Gandasegui Arahuetes J, Sánchez Hernández A, López-Abán J, Vicente Santiago B, Muro A. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for early detection of *Schistosoma mansoni* in stool samples: a diagnostic approach in a murine model. Jex AR, editor. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2014;8(9):e3126.
 66. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, *et al*. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. Rodriguez A, editor. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Public 2011;5(1):e931.
 67. Molina I, Gómez i Prat J, Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Serre N, *et al*. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *The New England journal of medicine*. 2014;370(20):1899-908.
 68. Khare R, Espy MJ, Cebelinski E, Boxrud D, Sloan LM, Cunningham SA, *et al*. Comparative evaluation of two commercial multiplex panels for detection of gastrointestinal pathogens by use of clinical stool specimens. *Journal of clinical microbiology* 2014;52(10):3667-73.