

ANEXO III. Pruebas de laboratorio para el diagnóstico de sarampión y rubeola

a) Muestras clínicas para la investigación de casos sospechosos de sarampión y rubéola

Siempre se deben recoger **tres muestras clínicas**: suero, exudado faríngeo o nasofaríngeo y orina. Es de extrema importancia acompañar el suero de muestras aptas para RT-PCR a fin de conseguir la máxima sensibilidad, diagnosticar casos en pacientes con antecedente de vacunación y caracterizar molecularmente los virus causantes⁸⁰.

Las recomendaciones para la recogida, manejo y envío de muestras al laboratorio se detallan en el Protocolo de Vigilancia de Sarampión, Rubeola y Síndrome de Rubeola Congénita, RENAVE 2013⁶.

En la investigación del SRC se puede utilizar cualquier otra muestra que, de acuerdo con el cuadro clínico y a juicio de los médicos clínicos, pueda contener virus. Ante un cuadro clínico de sospecha detectado de forma tardía, el diagnóstico de la infección congénita se podrá hacer de forma retrospectiva con muestras de archivo de sangre seca en papel tomadas en el momento del nacimiento para cribado de enfermedades metabólicas (prueba del talón).

Las pruebas de laboratorio tienen un rendimiento diferente según el momento en el que se hayan recogido las muestras clínicas. Para poder interpretar adecuadamente los resultados de las pruebas de laboratorio es fundamental tener en cuenta los días transcurridos entre el inicio de exantema y la toma de la muestra clínica.

b) Diagnóstico por detección directa (aislamiento del virus y RT-PCR).

A diferencia de lo que ocurre con la detección de anticuerpos, hay más probabilidad de que se detecten los virus cuando las muestras clínicas se han recogido en los primeros días tras el inicio de exantema.

El momento óptimo para la recolección de muestras para **aislamiento del virus** es durante los primeros 4 días tras la aparición del exantema. El virus puede detectarse en exudado nasofaríngeo, orina y sangre completa. Las concentraciones de virus en suero son muy bajas, por lo que no es una muestra adecuada para este propósito.

El genoma vírico se puede detectar mediante técnicas de amplificación (RT-PCR). La RT-PCR es una técnica más sensible, específica, rápida y sencilla que el aislamiento del virus en cultivo. De esta manera, el momento óptimo para detectar el virus en exudado faríngeo y en orina alcanza hasta 5 días después del inicio del exantema, aunque podría ser detectado con posterioridad, especialmente en orina. El empleo de técnicas múltiples permite realizar el diagnóstico diferencial entre sarampión y rubeola, así como con otros virus exantemáticos de manera simultánea.

Un resultado positivo a virus del sarampión o virus de la rubeola por estas técnicas siempre confirma el caso, salvo que haya antecedentes recientes de vacunación (figura 1A). Sin embargo, un resultado negativo a cultivo o RT-PCR, por sí solo, no permite descartar el caso, lo cual puede hacerse solamente tras un resultado serológico negativo en una muestra tomada en el momento adecuado (a partir del cuarto día después del comienzo de síntomas). o tras la confirmación mediante PCR de la infección por otro agente causal (Figura 1A).

c) Diagnóstico serológico

Se recogerá una muestra de suero en el primer contacto con el paciente dentro de los primeros 28 días tras el inicio del exantema (figura 1B). La detección de anticuerpos específicos de clase IgM indica infección reciente. Es frecuente que aún no haya respuesta serológica

detectable en las muestras obtenidas en las primeras 72 horas (<4días), por lo que si la IgM es negativa debe recogerse una 2ª muestra de suero para evidenciar seroconversión. En los casos de reinfección, como los vacunados con dos dosis, la IgM puede ser negativa en muestras de suero tomadas a partir del 4º día tras el inicio del exantema. En estos casos es especialmente relevante realizar el diagnóstico por detección directa, puesto que los resultados del diagnóstico serológico pueden no ser concluyentes (Fig. 1C).

La detección de anticuerpos totales o de clase IgG indica infección pasada en un momento indeterminado. La IgG alcanza el valor máximo entre la 2ª y la 3ª semana tras el inicio del exantema. La respuesta inmune va madurando con el tiempo, aumentando progresivamente el grado de avidéz de los anticuerpos de clase IgG por los antígenos víricos frente a los que van dirigidos. La prueba de avidéz permite distinguir si los anticuerpos IgG provienen de una infección reciente primaria (baja avidéz) o de una infección pasada (alta avidéz). Por esta razón, el ensayo de avidéz de IgG se emplea para la confirmación de resultados positivos a IgM de rubéola tras una infección primaria. Además, el ensayo de avidéz de IgG permite caracterizar el fallo vacunal (primario o secundario) en los casos de sarampión vacunados con dos dosis.

d) Caracterización molecular de los virus. Genotipado y análisis de variantes.

Se utilizan técnicas establecidas por la OMS de RT-PCR, secuenciación y análisis filogenético de regiones del genoma de estos virus. Es indispensable diagnosticar con certeza los casos vacunales, trazar los patrones de circulación de las cepas, establecer una hipótesis sobre el origen importado o endémico de un caso y describir la ausencia de circulación endémica y documentar la eliminación en un área geográfica determinada. El genotipado solo puede realizarse sobre muestras clínicas en las que se haya detectado el virus bien por aislamiento o por RT-PCR. En el virus del sarampión la región mínima para asignar genotipo son los 450 nucleótidos (nt) que codifican el extremo carboxilo de la nucleoproteína (N-450). La OMS ha definido 24 genotipos del virus del sarampión (A, B1-B3, C1, C2, D1-D11, E, F, G1-G3, H1 y H2), pertenecientes a 8 grupos filogenéticos (A-H)⁸⁸.

Sin embargo, en la actual fase de eliminación el dato de genotipo por sí solo puede resultar insuficiente para describir con precisión los patrones de circulación de los virus y el origen de los casos. Por ello hay que extraer información más precisa y específica de las secuencias para llegar a definir el haplotipo y la variante. (Anexo II.2). Esta información de los virus circulantes se recoge nivel mundial en la base de dato MeaNS⁸⁹. Los laboratorios de referencia identifican las variantes de los casos que se producen en su país y aportan estos datos, así como la identificación de cada caso y la identificación de la muestra en MeaNS, a través de los informes anuales correspondientes. En los brotes se asigna el nombre, variante o “*named strain*” y número de muestra de MeaNS, del primer caso genotipado, siempre y cuando corresponda con el haplotipo mayoritario del brote. En la base de datos SIVIES, se han introducido los campos nombre de cepa, haplotipo y variante, para poder recoger esta información de cada caso.

En rubeola el genotipado se basa en una secuencia de 739 nt (del nt 8731 al nt 9469) de la región codificante del gen E1. Para la rubeola la OMS ha definido 12 genotipos definitivos (1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G, 1H, 1I, 1J, 2A, 2B, 2C) y uno provisional (1a)⁷⁸.

Figura 1A. Anexo III. Diagnóstico Molecular (RT-PCR) de casos sospechosos de sarampión o de rubeola con muestras de Exudado faríngeo, nasofaríngeo o de orina.



1. Utilizar una RT-PCR multiplex que permita amplificar a la vez el genoma de sarampión y rubeola o hacerlo por separado en paralelo, para todos los casos sospechosos de sarampión o rubeola.
2. Utilizar en la medida de lo posible una RT-PCR en tiempo real específica para detectar cepas de genotipo vacunal (Roy et al. Rapid Identification of Measles Virus Vaccine Genotype by Real-Time PCR. J Clin Microbiol. 2017 55(3):735-743). En cualquier caso, todas las muestras se secuenciarán para confirmar el genotipo, para lo cual se enviarán al laboratorio de referencia si no se hiciese en origen.
3. Solo se podrá descartar el caso cuando se haya confirmado por PCR infección por: sarampión (en las sospechas de rubeola), rubeola (en las sospechas de sarampión), Parvovirus B19, o Dengue, Chikungunya o Zika, si existe un antecedente epidemiológico que lo justifique. Esto no impide que se puedan haber detectado genoma de otros agentes, pero esta circunstancia por sí misma no permite en sí misma descartar el caso.

Figura 1B. Anexo III. Diagnóstico Serológico de casos sospechosos de sarampión o de rubeola con muestras de suero tomadas en tiempo oportuno: ≥ 4 días post exantema en sarampión y ≥ 6 días post exantema en rubéola

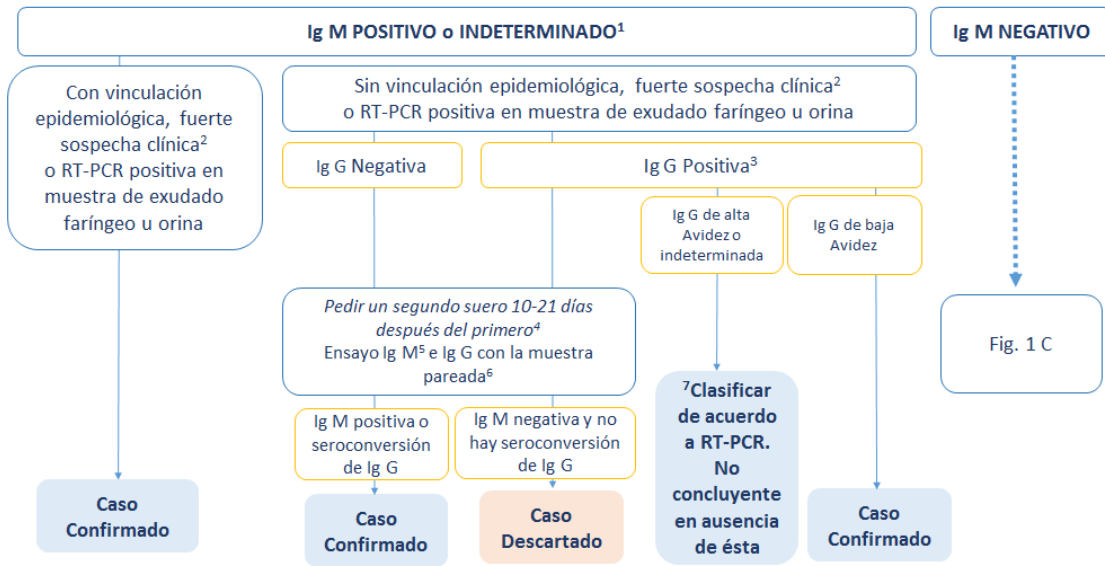


Figura 1B*. Anexo III. Diagnóstico Serológico de casos sospechosos de sarampión o rubeola con muestras de suero tomadas en tiempo no oportuno: < 4 días post exantema en sarampión y < 6 días post exantema en rubéola

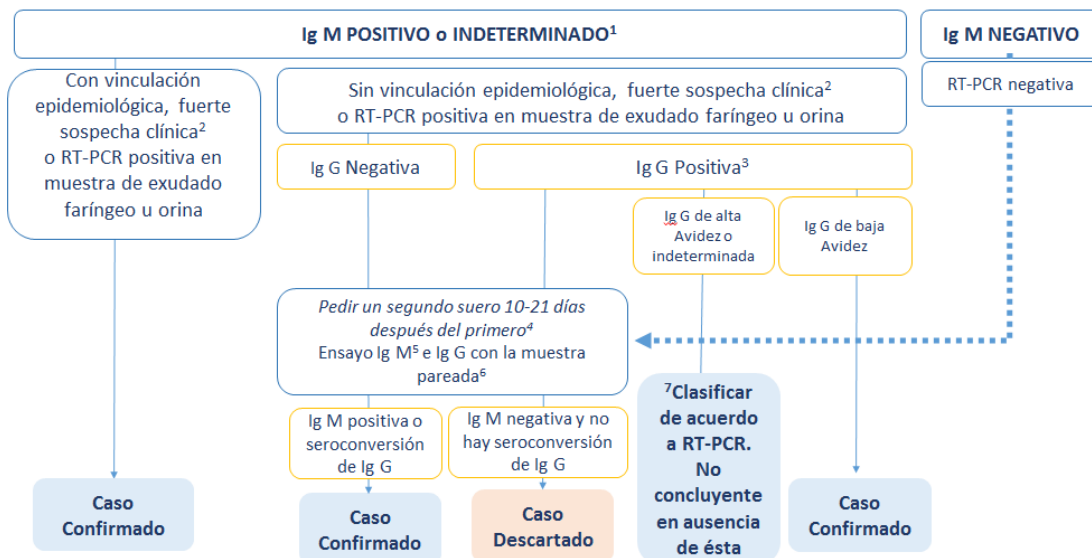
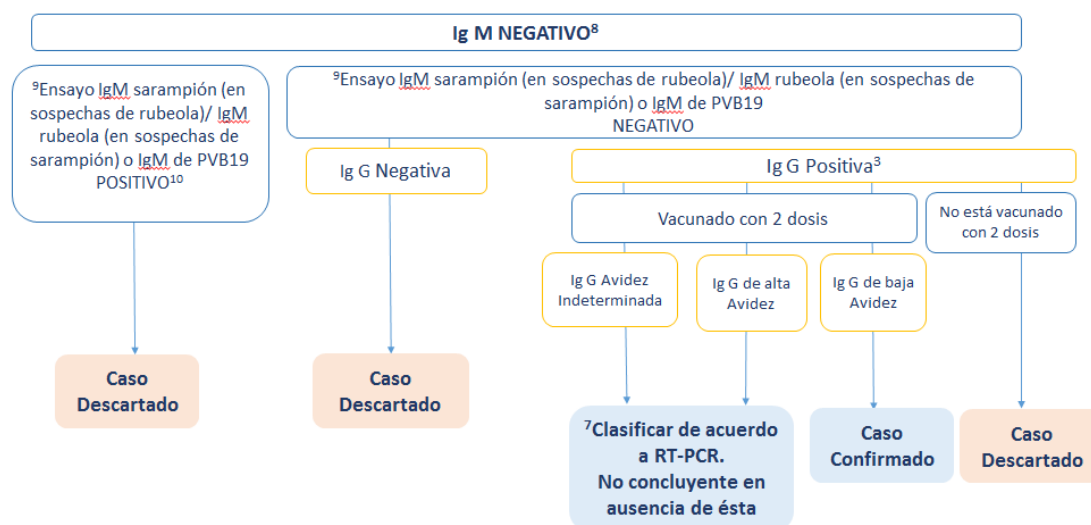


Fig 1C. Anexo III. Diagnóstico Serológico de casos sospechoso de sarampión o de rubeola con muestras de suero tomadas en tiempo oportuno: ≥ 4 días post exantema en sarampión y ≥ 6 días post exantema en rubéola.



1. Los resultados indeterminados a IgM requieren la repetición del ensayo. Todos estos casos se confirmarán en el LNR.
2. En todos los casos sospechosos de rubeola en mujeres embarazadas con un resultado positivo o indeterminado a IgM, se determinará la avidéz de IgG, siguiendo el apartado correspondiente de este algoritmo y evaluando los resultados según se indica en la nota al pie de página 3. Estos casos no se pueden confirmar sólo por vinculación epidemiológica o fuerte sospecha clínica.
3. En los casos sin vinculación epidemiológica o fuerte sospecha clínica se debe determinar la IgG y en los resultados positivos la avidéz de IgG para poder clasificar el caso. Una baja avidéz de IgG está asociada con una infección primaria. Una alta avidéz de IgG nos indica una infección pasada, que podría ser compatible con una reinfección.
4. Si el primer suero es IgG negativo, la seroconversión puede demostrarse con un segundo suero tomado 10-21 días después del exantema, para poder confirmar el caso.
5. En la mayoría de los casos, una sospecha con un resultado indeterminado de IgM en el primer suero y un resultado positivo en el segundo confirma el caso. Sin embargo, la evaluación del título de IgG puede ser necesario para confirmar el resultado.
6. Las parejas de muestras de suero deben ensayarse a la vez a IgG. La seroconversión o determinación de un aumento significativo confirma el caso. La ausencia de seroconversión (ambas IgG negativas) descarta el caso.
7. Una alta avidéz de IgG nos indica una infección pasada, que podría ser compatible con una reinfección (personas vacunadas con dos dosis o con una infección natural en el pasado). Sin embargo, en estos casos el resultado del diagnóstico serológico no nos permite por sí mismo clasificar el caso, por lo que es esencial realizar una RT-PCR con las muestras adecuadas (exudado faríngeo o nasofaríngeo y orina). Un resultado positivo confirmaría el caso, mientras que un resultado negativo lo descartaría, siempre que las muestras para PCR hayan sido tomadas en tiempo oportuno.
8. En los casos de reinfección (personas vacunadas con dos dosis o con una infección natural en el pasado) puede haber un resultado de IgM negativo. En estos casos es esencial realizar una RT-PCR con las muestras adecuadas (exudado faríngeo o nasofaríngeo y orina) puesto que los resultados del diagnóstico serológico pueden no ser concluyentes. Todos estos casos se confirmarán en el LNR.
9. En todos los casos negativos a sarampión o rubeola incluiremos la determinación de IgM de rubeola o sarampión, respectivamente e IgM de PVB19 y a dengue, zika o chikungunya en caso de antecedentes de viaje a zona endémica.
10. Para la interpretación de las IgMs positivas a sarampión y rubéola, se seguirán los algoritmos correspondientes.