

Organización Mundial de la Salud

Manual para el diagnóstico de laboratorio de la infección por los virus del sarampión y de la rubéola

Segunda edición

Índice

1. Finalidad	8
2. Introducción	9
2.1 Carga mundial de enfermedad por sarampión y rubéola	9
2.2 Sarampión	10
2.2.1 Epidemiología, infección y respuesta inmunitaria	10
2.2.2 Virus del sarampión.....	12
2.2.3 Diagnóstico clínico y de laboratorio	13
2.3 Rubéola	15
2.3.1 Características epidemiológicas, infección y respuesta inmunitaria.....	15
2.3.2 Síndrome de rubéola congénita e infección congénita por el virus de la rubéola.....	17
2.3.3 Virus de la rubéola	18
2.3.4 Diagnóstico clínico y de laboratorio	19
2.4 Estrategia mundial de la OMS para el control del sarampión y prevención del SRC.....	19
2.4.1 Reducción de la mortalidad por sarampión y eliminación regional.....	19
2.4.2 Prevención del SRC.....	21
2.4.3 Control integrado del sarampión y de la rubéola.....	22
3. Importancia y función del laboratorio en el control del sarampión y la prevención del síndrome de rubéola congénita	23
3.1 Función del laboratorio en la vigilancia epidemiológica del sarampión y la rubéola.....	23
3.2 Estructura y actividades de la red de laboratorios en la vigilancia del sarampión y la rubéola....	24
3.3 Coordinación de la red.....	27
3.4 Epidemiología molecular y genotipificación	27
3.4.1 Sarampión.....	27
3.4.2 Rubéola	30
4. Recogida de muestras, envío, recibo y procesamiento	34
4.1 Documentación de las muestras recogidas.....	35
4.2 Muestras de suero destinadas a la detección de anticuerpos	35
4.2.1 Momento oportuno de recogida de la muestra sanguínea para la detección de IgM de sarampión y rubéola.....	36
4.2.2 Recogida y procesamiento de las muestras de suero y sangre seca en papel filtro	36
4.2.3 Almacenamiento y envío de las muestras de suero.....	37
4.3 Muestras destinadas al aislamiento viral.....	38
4.3.1 Muestras nasofaríngeas destinadas al aislamiento viral del sarampión y la rubéola	38
4.3.2 Muestra de orina destinada al aislamiento y detección del virus del sarampión	39
4.3.3 Muestra de sangre destinada al aislamiento y detección del virus del sarampión.....	40
4.4 Muestras destinadas a la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa.....	40
4.5 Otras técnicas de obtención de muestras (muestras de sangre seca y de secreciones bucales)	40
4.5.1 Obtención, almacenamiento y procedimientos de envío de la sangre seca	41

4.5.2	Obtención, almacenamiento y procedimientos de envío de las secreciones bucales.....	42
4.6	Precauciones generales de seguridad al recibir las muestras	43
5.	Diagnóstico de laboratorio del sarampión y la rubéola	44
5.1	Pruebas de IgM	44
5.1.1	ELISA de captura de IgM	44
5.1.2	Ensayo inmunoenzimático indirecto de IgM específica del virus	45
5.1.3	Diagnóstico diferencial de laboratorio de sarampión y rubéola	46
5.1.4	Interpretación de los resultados de la prueba de IgM en pacientes con antecedente de vacunación reciente.....	47
5.1.5	Interpretación de los resultados de muestras con pruebas de IgM positivas simultáneamente para sarampión y rubéola	48
5.2	Pruebas de anticuerpos de tipo IgG	48
5.2.1	Prueba de avididad de la IgG.....	49
5.3	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa	49
5.4	Aislamiento del virus en cultivo celular.....	50
5.4.1	Sarampión.....	50
5.4.2	Rubéola.....	51
6.	Manejo de los datos y notificación.....	52
6.1	Objetivos de el manejo de los datos	52
6.2	Registro del recibo de la muestra	54
6.3	Registro de los resultados	55
6.4	Notificación de la actividad del laboratorio y los resultados.....	55
6.4.1	Retroalimentación a los equipos del programa ampliado de inmunización.....	56
6.4.2	Informes mensuales a la OMS	56
7.	Transporte seguro de las muestras y de los aislados clínicos	57
7.1	Planificación.....	57
7.2	Embalaje.....	58
7.3	Preparación y envío	58
8.	Garantía de la calidad de los laboratorios de la red.....	60
8.1	Establecimiento de sistemas de control de calidad	60
8.1.1	Personal.....	60
8.1.2	Dotación de personal	61
8.1.3	Recursos humanos	61
8.1.4	Asignación de espacios	61
8.2	Procedimientos estandarizados de trabajo.....	62
8.3	Documentación	63
8.4	Equipo e instrumentos	63
8.5	Insumos	64
8.5.1	Materiales de referencia	64
8.5.2	Reactivos (incluidos los kits de diagnóstico).....	64
8.6	Seguridad de laboratorio.....	65
8.7	Accreditación anual	66

9. Anexos	69
9.1 Modelo del formulario de solicitud de los laboratorios de sarampión y de rubéola	69
9.2 Extracción de IgM específica del sarampión a partir de muestras de sangre seca en papel filtro y detección utilizando el ensayo indirecto de anticuerpos IgM del sarampión de Dade Behring (según [39]).....	71
9.2.1 Preparación de reactivos:.....	71
9.2.2 Elución de la mancha de sangre.....	71
9.2.3 Absorción del eluido	71
9.2.4 Protocolo del inmunoensayo (sólo para análisis de sangre seca en papel filtro).....	72
9.2.5 Determinación de los resultados	72
9.2.6 Interpretación de los resultados	72
9.2.7 Observación referente a la IgM específica contra la rubéola a partir de muestras de sangre seca.....	73
9.3 Control de calidad y resolución de problemas de las pruebas serológicas de sarampión y rubéola.....	74
9.3.1 Control de calidad	74
9.3.2 Solución de problemas de los ensayos inmunoenzimáticos.....	75
9.4 Aislamiento e identificación del virus del sarampión y de la rubéola a partir de cultivo celular.....	78
9.4.1 Recogida y envío de muestras clínicas.....	78
9.4.2 Muestras de las vías respiratorias	78
9.4.3 Muestras de orina	79
9.4.4 Muestras de sangre.....	79
9.4.5 Envío de las muestras clínicas y de los aislados virales.....	79
9.4.6 Procesamiento de las muestras	80
9.4.7 Introducción al cultivo celular	81
9.4.8 Exigencia de genética de las células Vero/SLAM	82
9.4.9 Materiales necesarios para el mantenimiento de las células Vero/SLAM	83
9.4.10 Mantenimiento de las células Vero/SLAM	83
9.4.11 Infección de células Vero/SLAM para el aislamiento viral del sarampión	84
9.4.12 Infección de células Vero/SLAM para el aislamiento viral de la rubéola.....	86
9.4.13 Preparación de cultivos patrón (congelados) de células Vero/SLAM.....	87
9.4.14 Confirmación de aislamiento viral del sarampión por inmunofluorescencia	88
9.4.15 Prueba de inmunofluorescencia indirecta de detección del virus de la rubéola en cultivo celular.....	89
9.4.16 Prueba inmunocolorimétrica de detección de virus de la rubéola en cultivo celular.....	92
9.5 Embalaje de muestras y aislados clínicos (Reemplazar con el apartado 9.5 ACTUALIZADO).....	96
9.5.1 Instrucción de embalaje P650. Esta instrucción de embalaje se aplica a las muestras de diagnóstico (UN 3373).....	96
9.5.2 Instrucción de embalaje P620. Esta instrucción de embalaje se aplica a los cultivos y a los aislados virales (UN No. 2814 y 2900).....	97
9.6 Composición de los medios y reactivos	99
10. Lectura complementaria sugerida	101
10.1 Impacto mundial del sarampión y la rubéola	101
10.2 Estrategias de control.....	101
10.3 Laboratorio.....	102
10.4 Seguridad y transporte de muestras de laboratorio	103
11. Bibliografía	104

Lista de figuras

Figura 1. Tasa de incidencia de sarampión notificada por 100,000 habitantes, 2004	9
Figura 2. Características clínicas de un caso típico de sarampión. Evolución temporal desde la aparición de la enfermedad (según [4, 6 y 7])	11
Figura 3. Respuestas inmunitarias en el sarampión agudo (según [7])	12
Figura 4. Diagrama de la partícula del virus del sarampión	13
Figura 5. Características clínicas de una infección típica por el virus de la rubéola. Evolución desde el comienzo de la enfermedad (según [6, 13, 14])	16
Figura 6. Respuesta inmunitaria en un caso típico de infección	17
Figura 7. Diagrama de la partícula del virus de la rubéola correlacionado con el mapa genético (según [13, 17]). Las glicoproteínas E1 y E2 existen como heterodímeros	18
Figura 8. Países que aplican la vacuna antirrubéolica en los esquemas	22
Figura 9. Red de laboratorios para actividades de vigilancia del sarampión y la rubéola en cada nivel	26
Figura 10. Distribución mundial de los genotipos del virus del sarampión entre 1995 y 2006 en las regiones de la OMS que no han eliminado aún el sarampión (según WER Nov 05).....	30
Figura 11. Distribución de los virus de la rubéola entre 1995 y 2005.....	33
Figura 12. Embalaje de las muestras de suero. Muestra individual en una bolsa o envase hermético.....	37
Figura 13. Embalaje de las muestras de suero. Muestras múltiples en un contenedor isotérmico	38
Figura 14. Modelo del formato de tarjeta de recogida de muestras de sangre seca en papel filtro	41
Figura 15. Diagrama de la prueba ELISA de captura de IgM.....	45
Figura 16. Diagrama de la prueba ELISA indirecta de IgM (Suero preabsorbido a fin de extraer la IgG y el factor reumatoideo)	46
Figura 17. Muestra única de sangre tomada hasta el día 28 en Regiones SIN metas de eliminación de la rubéola.....	47
Figura 18. En países con incidencia muy baja de sarampión y vacunación antirrubéolica baja o ausencia de ella en Regiones SIN metas de eliminación de la rubéola.....	47
Figura 19. La serie A muestra el efecto citopático causado por infección con el virus del sarampión en las células Vero/SLAM.	82
Figura 20. Resultados característicos de la detección del virus de la rubéola en cultivo celular usando dos inmunoensayos diferentes.....	82

Lista de cuadros

Cuadro 1. Secuencia de la infección por el virus del sarampión en una enfermedad típica sin complicaciones (según [6])	11
Cuadro 2. Características clínicas de una infección típica por el virus de la rubéola. Evolución desde el comienzo de la enfermedad (según [6, 14, 15]).....	15
Cuadro 3. Estimación de las defunciones por sarampión y porcentaje de reducción por región geográfica entre 1999 y 2004 (según [2])	20
Cuadro 4. Función del laboratorio en el control y la eliminación del sarampión y la rubéola	23
Cuadro 5. Cepas de referencia que se deben utilizar en el análisis genético de los virus del sarampión de tipo salvaje [10]	29
Cuadro 6. Cepas de referencia en el análisis genético de los virus de la rubéola de tipo salvaje [18].....	32
Cuadro 7. Requisitos mínimos de las pruebas serológicas del sarampión y la rubéola y del aislamiento viral, en función de la fase	34
Cuadro 8. Densidad del agua a diversas temperaturas y presiones atmosféricas.....	77

Abreviaturas y siglas

µg	microgramo
µl	microlitro
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
B95a	línea celular linfoblastoide B de tití, transformada por el virus Epstein-Barr
CDC	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Atlanta, EUA
Células Vero	línea celular continua derivada de riñón de mono verde africano
CO ₂	dióxido de carbono
DMEM	medio esencial mínimo de Dulbecco
DMEM-PS	medio esencial mínimo de Dulbecco con penicilina y estreptomina
DMEM-PS	medio esencial mínimo de Dulbecco con penicilina, estreptomina y genitcina
DMSO	dimetil sulfóxido
EDTA	ácido etilendiamino tetracético
ELISA	ensayo inmunoenzimático por adsorción
FITC	isotiocianato de fluoresceína
g	fuerza centrífuga relativa
g	gramo
IATA	Asociación del Transporte Aéreo Internacional
IgA	inmunoglobulina de clase A
IgG	inmunoglobulina de clase G
IgM	inmunoglobulina de clase M
kPa	kilopascal
MEM	medio esencial mínimo
mg	miligramo
ml	mililitro
nm	nanómetro
OACI	Organización de Aviación Civil Internacional
OMS	Organización Mundial de la Salud
RCP	reacción en cadena de la polimerasa
RCP-TR	reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa
rpm	revoluciones por minuto
SLAM	molécula activadora de la señalización del linfocito; también conocida como CDw150
SRC	Síndrome de rubéola congénita
TMB	3,3',5,5'tetrametilbencidina
UNICEF	Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia
Vero/SLAM	células Vero que expresan por transfección la molécula activadora de la señalización del linfocito

Agradecimientos

La Organización Mundial de la Salud y el Departamento de Inmunización, Vacunas y Productos Biológicos agradecen a las siguientes personas su contribución en la preparación del presente documento:

- Dr. Ray Sanders**, médico adjunto del laboratorio, en St. John's, Worcester, Reino Unido
- Dr. Paul Rota**, División de enfermedades virales y rickettsias del Centro Nacional para las Enfermedades Infecciosas, Atlanta, EUA
- Dr. Joe Icenogle**, División de enfermedades virales y rickettsias del Centro Nacional para las Enfermedades Infecciosas, CDC, Atlanta, EUA
- Dr. David Featherstone**, Departamento de Inmunización, Vacunas y Productos Biológicos, Organización Mundial de la Salud, Ginebra
- Dra. Marilda Siqueira**, Departamento de Virología, FIOCRUZ, Ministerio de Salud, Río de Janeiro, Brasil
- Dr. Mick Mulders**, Organización Mundial de la Salud, Oficina Regional para Europa, Copenhague
- Dr. Annick Dosseh**, Organización Mundial de la Salud, Oficina Regional para África, Harare
- Dr. Kaz Kojima**, Programa Ampliado de Inmunización, Organización Mundial de la Salud, Oficina Regional para el Pacífico Occidental, Manila
- Dr. Nalini Ramamurthy**, Departamento de Inmunización, Vacunas y Productos Biológicos, Organización Mundial de la Salud, Oficina Regional para Asia Sudoriental, Nueva Delhi
- Dr. Masato Tashiro**, Departamento de Virología III, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (NIID), Tokio, Japón
- Dra. Ana Maria Bispo de Filippis**, Unidad de Inmunizaciones, Organización Panamericana de la Salud, OPS, Washington, EUA
- Dra. Carolina Danovaro**, Unidad de Inmunizaciones, Organización Panamericana de la Salud, OPS, Washington, EUA
- Béatrice Carpano**, Unidad de Inmunizaciones, Organización Panamericana de la Salud, OPS, Washington, EUA

1. Finalidad

El propósito del presente manual es prestar apoyo a las actividades de control del sarampión y de prevención de la infección congénita por el virus de la rubéola:

- presentando información exacta sobre los patógenos, las enfermedades, las respuestas inmunitarias y las estrategias de prevención;
- describiendo la función asignada al laboratorio en el control y la prevención de las enfermedades;
- describiendo las exigencias de una vigilancia eficaz de laboratorio; y
- presentando descripciones detalladas de los procedimientos recomendados, con miras a un diagnóstico de laboratorio eficaz de la infección por los virus del sarampión y de la rubéola y aportando descripciones generales de los procedimientos de caracterización genética de las cepas salvajes de estos virus.

El manual está destinado a los virólogos y a los auxiliares que trabajan en los laboratorios que participan en los esfuerzos e iniciativas de control del sarampión y de la rubéola. También puede ser de interés para los directores de los programas de control del sarampión y de prevención de la infección congénita por el virus de la rubéola y al personal de terreno, quienes conocerán mejor la función del laboratorio y podrán recurrir a él apropiadamente.

Hasta enero de 2005, cuatro Regiones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) habían adoptado metas de eliminación del sarampión (Américas, Europa, Mediterráneo Oriental y Pacífico Occidental, y dos habían adoptado objetivos de eliminación o de reducción sustancial de la rubéola (Américas y Europa respectivamente). Las dos regiones restantes (África y Asia Sudoriental) se habían fijado metas de reducción de mortalidad por sarampión. En ese momento, no obstante, cerca de 60% de los países y territorios que reportan a la OMS había introducido en sus esquemas regulares de vacunación la vacuna antirrubéólica, generalmente en forma de vacuna combinada contra el sarampión, la parotiditis y la rubéola (vacuna triple viral). La integración de la vigilancia del sarampión y de la rubéola, en especial con respecto a la confirmación de la infección por el laboratorio, constituye una estrategia razonable y costo-efectiva en la mayoría de las circunstancias. En este manual se hace referencia a la vigilancia integrada del sarampión y la rubéola. Los Estados Miembros en las Regiones de la OMS que no han adoptado las metas de control de la rubéola y cuyos programas rutinarios de inmunización no suministran la vacuna contra la rubéola, deben consultar a la Oficina Regional de la OMS y al coordinador de los laboratorios regionales a fin de obtener las recomendaciones específicas, relativas a la vigilancia y a la confirmación por el laboratorio de la infección por el virus de la rubéola.

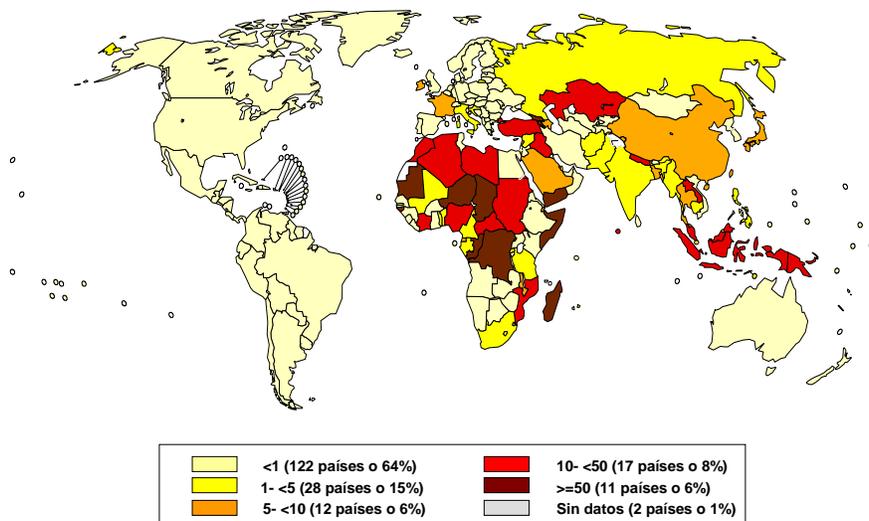
2. Introducción

2.1 Carga mundial de enfermedad por sarampión y rubéola

Antes de la introducción de las vacunas antisarampionosas en los años sesenta, casi todas las personas contraían el sarampión, generalmente durante la niñez. En consecuencia, se presentaban unos 130 millones de casos y más de 2,5 millones de defunciones anuales debidas al sarampión (sobre todo en niños) [1]. Pese a la existencia de una vacuna antisarampionosa segura, eficaz y de costo relativamente bajo durante más de 40 años, el sarampión cobra hoy la vida de más niños, que ninguna otra de las enfermedades prevenibles mediante vacunación, esencialmente en los países en desarrollo. En 2004, se presentaron entre 20 y 30 millones de casos de sarampión en el mundo y 453.000 defunciones (límites de incertidumbre: 329.000 a 595.000) [2], un tercio de todas las defunciones prevenibles mediante vacunación en la niñez. La infección por el virus del sarampión se presenta con fiebre alta, exantema y tos, que afectan sobre todo a los niños, pero también a los adultos jóvenes. Los niños no suelen morir directamente de sarampión, sino de sus complicaciones como neumonía y diarrea, causadas por la inmunodepresión que provoca la infección por este virus. La enfermedad también puede conducir a discapacidades definitivas como daño cerebral, ceguera y sordera. El sarampión es una de las enfermedades más contagiosas conocidas en el hombre y ocurre con frecuencia en epidemias explosivas.

En aquellos países que cuentan con una amplia distribución de la vacuna antisarampionosa las complicaciones graves y las muertes por sarampión son poco frecuentes. La mortalidad más alta se observa en los países más pobres. Los esfuerzos masivos destinados a mejorar la cobertura de vacunación en los países con más alta mortalidad en el mundo dieron lugar a una disminución del 48% de defunciones por sarampión entre 1999 y 2004; no obstante, más del 47% de defunciones por sarampión ocurre aún en la región de África de la OMS. [2]

Figura 1. Tasa de incidencia de sarampión notificada por 100,000 habitantes, 2004



Fuente: Base de datos de OMS/IVB, 2005
Datos hasta septiembre de 2005

Los límites y las denominaciones presentados en este mapa no implican, por parte de la Organización Mundial de la Salud, juicio alguno en cuanto a la condición jurídica de ningún país, territorio, ciudad o zona ni de sus autoridades, ni respecto al trazado de sus fronteras o límites. Las líneas discontinuas en el mapa representan en forma aproximada las fronteras sobre las cuales quizá no exista todavía pleno acuerdo.
© OMS 2005. Derechos reservados.



La rubéola es una enfermedad leve que se presenta con fiebre y exantema. Su importancia de salud pública radica en que la infección durante los primeros meses del embarazo suele alterar el desarrollo fetal [3]. La infección del feto por el virus de la rubéola puede dar lugar a aborto espontáneo, muerte fetal o a malformaciones congénitas graves en el recién nacido. El síndrome de rubéola congénita (SRC) es una causa frecuente de ceguera, sordera, cardiopatía congénita y retraso mental. Se calcula que en todo el mundo, más de 100.000 niños nacen con SRC cada año. La mayoría de estos casos ocurre en los países en desarrollo que aún no han introducido la vacuna antirrubéolica [3].

El alcance y la calidad de la vigilancia del SRC siguen siendo deficientes, con una notificación inferior al 0,1% de los casos estimados. Muchos países todavía no han incorporado el SRC en sus sistemas de vigilancia de enfermedades transmisibles, y algunos países con sistemas de vigilancia de rubéola congénita bien establecidos no reportan los datos completos a la OMS y al Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF). Antes de poder medir la carga de enfermedad real por rubéola, es necesario que más países establezcan sistemas eficaces de vigilancia del SRC y notifiquen sus resultados a la OMS y al UNICEF.

2.2 Sarampión

2.2.1 Epidemiología, infección y respuesta inmunitaria

El término sarampión deriva del latín, *sirimpŏ, -ōnis* que significa erupción de la piel. En inglés, la enfermedad se denomina en ocasiones “*rubeola*” (de *rubeolus*, latín por rojizo); el adjetivo morbiliforme (de *morbus*, latín por enfermedad) expresa relación con el sarampión. Existen referencias al sarampión desde el siglo VII. En el siglo X, Rhazes, un médico persa, describió el sarampión como una enfermedad más temible que la viruela. Antes de la introducción de los programas de vacunación, el sarampión era casi siempre una enfermedad de la niñez. En las zonas densamente pobladas, el sarampión afectaba con mayor frecuencia a los niños entre 3 y 4 años de edad. En las zonas urbanas con menor densidad de población y en las zonas rurales, la incidencia más alta se observaba en los niños de 5 a 10 años de edad, quienes contraían la enfermedad al entrar a la escuela [4].

En los climas templados, las epidemias de sarampión tendían a ocurrir con intervalos de 2 a 5 años y una duración de 4 a 5 meses. En general, entre más grande era la comunidad, más corto era el intervalo entre las epidemias. Los programas de vacunación antisarampionosa han tenido un efecto considerable sobre la incidencia de la enfermedad y sus complicaciones. También se ha modificado la edad más frecuente de adquisición del sarampión en estas poblaciones. Después de períodos prolongados de alta cobertura de vacunación en los países desarrollados, la transmisión del sarampión ocurre ahora principalmente en personas que nunca han sido vacunadas y en niños mayores que no presentaron seroconversión después de haber recibido la vacuna. En los países con alta cobertura de vacunación, aún se pueden presentar brotes de sarampión. Tales brotes demuestran una brecha de la inmunidad en la población correspondiente.

El sarampión es una de las enfermedades que se transmite con mayor facilidad. La transmisión ocurre principalmente por la propagación de microgotas o el contacto directo con secreciones nasales o faríngeas de una persona infectada. Con menor frecuencia, se disemina por los núcleos de las gotitas infecciosas aerosolizadas y transportadas por el aire o por contacto indirecto con artículos recientemente contaminados. El sarampión es sumamente contagioso y presenta una tasa de ataque secundario superior al 90% en las personas susceptibles. Varios factores tienden a aumentar la gravedad del sarampión en los países en desarrollo. Por ejemplo, el hacinamiento facilita la transmisión del virus de persona a persona y aumenta la probabilidad de una exposición a altas cantidades de virus [5]. El virus de la vacuna antisarampionosa no es transmisible.

Después de la infección, el virus del sarampión invade el epitelio respiratorio de la nasofaringe y se disemina hacia los ganglios linfáticos regionales (cuadro 1). Después de 2 a 3 días de replicación

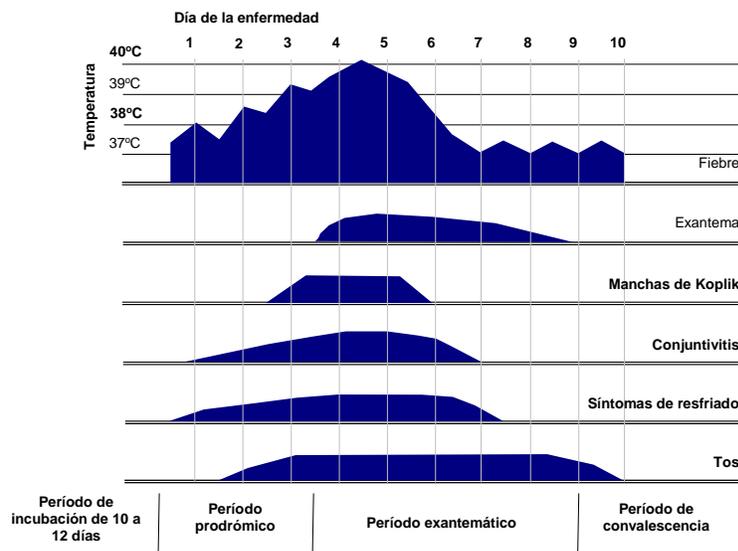
en estos focos, la viremia primaria extiende la infección al sistema reticuloendotelial. Tras la multiplicación continua del virus, ocurre una viremia secundaria entre 5 y 7 días después de la infección, que dura de 4 a 7 días. Durante esta viremia, puede ocurrir infección y nueva replicación del virus en la piel, las conjuntivas, las vías respiratorias y otros órganos, como el bazo, el timo, el pulmón, el hígado y el riñón. La viremia alcanza su punto máximo entre los días 11 y 14 después de la infección y luego disminuye rápidamente en pocos días.

Cuadro 1. Secuencia de la infección por el virus del sarampión en una enfermedad típica sin complicaciones (según [6])

Día	Evento
0	El virus del sarampión en las microgotas respiratorias entra en contacto con la superficie epitelial de la nasofaringe. Infección de células epiteliales y multiplicación del virus.
1 a 2	Propagación del virus al tejido linfático regional.
2 a 3	Viremia primaria.
3 a 5	Multiplicación del virus del sarampión en el epitelio respiratorio, ganglios linfáticos regionales y focos distantes.
5 a 7	Viremia secundaria.
7 a 11	Establecimiento de la infección en la piel y otros focos, incluidas las vías respiratorias.
11 a 14	Virus en la sangre, las vías respiratorias, la piel y otros órganos.
15 a 17	Disminución y luego desaparición de la viremia, el contenido viral de los órganos disminuye rápidamente a medida que aparece la inmunidad.

La infección de las vías respiratorias da lugar a la tos y a la rinitis características (figura 2) y a complicaciones menos frecuentes como laringitis obstructiva aguda, bronquiolitis y neumonía. La lesión generalizada de las vías respiratorias causa pérdida de cilios y predispone a infecciones bacterianas secundarias, como neumonía y otitis media. Las reacciones inmunitarias al virus en las células endoteliales de los capilares dérmicos dan origen al exantema y al enantema del sarampión (manchas de Koplik); se piensa que la interacción entre las células infectadas por el virus y los factores locales de la inmunidad celular contribuye a la aparición de la encefalitis provocada por el sarampión [4]

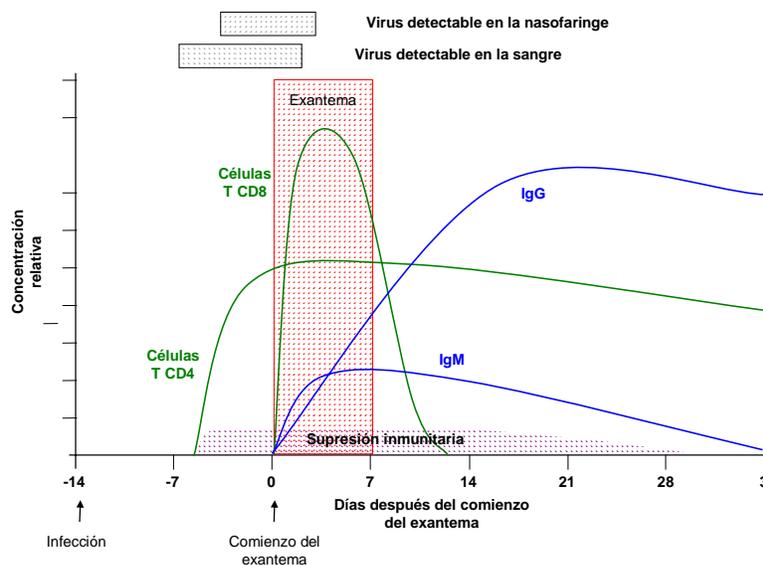
Figura 2. Características clínicas de un caso típico de sarampión. Evolución temporal desde la aparición de la enfermedad (según [4, 6 y 7])



Los anticuerpos de tipo inmunoglobulina de clase M (IgM) e IgG se producen durante la respuesta inmunitaria primaria y se pueden detectar en el suero pocos días después de la aparición del exantema (figura 3). Usando ensayos sensibles como las pruebas inmunoenzimáticas por adsorción (ELISA) de IgM, 90 % de casos de sarampión son positivos a los 3 días de iniciado el exantema [8]. Las concentraciones de anticuerpos IgM alcanzan su punto máximo después de 7 a 10 días y luego disminuyen rápidamente y rara vez son detectables después de 6 a 8 semanas. Las concentraciones de anticuerpos IgG alcanzan su punto máximo hacia las 4 semanas y persisten mucho tiempo después de la infección. También se producen anticuerpos de tipo IgA sérica e IgA secretora [9].

La reexposición al virus del sarampión genera una fuerte respuesta inmunitaria de reconocimiento, con un rápido aumento de los anticuerpos IgG, que previene la enfermedad clínica. Parece que una vez que el sistema inmunitario se ha sensibilizado mediante la infección natural, la inmunidad es de por vida. La respuesta inmunitaria celular, que comprende linfocitos T citotóxicos y posiblemente células citolíticas naturales (“natural killers”), desempeña una función primordial en la inmunidad y en la recuperación de la infección aguda. Los pacientes con defectos de la inmunidad mediada por células padecen a menudo infecciones sarampionosas progresivas y graves y presentan un riesgo de muerte considerablemente más alto. La supresión inmunitaria específica del sarampión empieza con la aparición de la enfermedad clínica, antes del exantema y continúa durante varias semanas después de la recuperación aparente [7].

Figura 3. Respuestas inmunitarias en el sarampión agudo (según [7])



2.2.2 Virus del sarampión

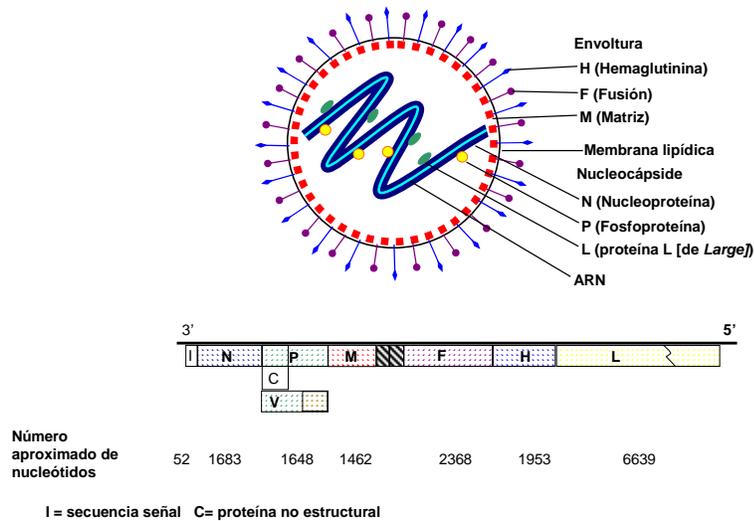
El virus del sarampión es un paramyxovirus perteneciente al género *Morbillivirus*. Los paramyxovirus deben su nombre a su afinidad por las membranas mucosas (del griego *myxa*, por moco). Es un virus polimorfo cuyo diámetro oscila entre 100 y 200 nm, con un diámetro medio de 150 nm. Dentro de los morbillivirus, es cercano al grupo de virus de la peste bovina y más distante de los virus del moquillo o distemper canino. En la patogenia son importantes dos glucoproteínas de la cubierta de la membrana. Una es la proteína F (fusión), encargada de la fusión de los virus con las membranas de las células del huésped, la penetración viral y la hemólisis y la otra es la proteína H (hemaglutinina), cuya función es la unión de los virus a las células (figura 4). Aunque existe sólo un serotipo del virus del sarampión, los virus salvajes presentan una gran variabilidad genética. Actualmente, la OMS reconoce 23 genotipos del virus del sarampión con 16 de ellos

definidos desde 1990 [10]. Esta variación del genotipo no parece tener importancia biológica, pues no modifica la eficacia de la vacuna.

El virus posee un genoma no segmentado constituido por una cadena de ácido ribonucleico (ARN) de polaridad negativa, con una disposición lineal de los genes, separados por el trinucleótido intergénico GAA. Cada gen contiene un marco de lectura abierto único (excepto la fosfoproteína P), señales de iniciación y de terminación de transcripción y una señal de poliadenilación. El genoma completo del virus del sarampión consta de 15.894 nucleótidos. En el banco de datos EMBL/GenBank se puede encontrar el ejemplo de una secuencia genómica completa con los números de acceso K01711 y X16565.

El virus del sarampión es viable durante menos de 2 horas a temperatura ambiente en las superficies y los objetos, pero los virus aerosolizados permanecen infectantes durante 30 minutos o más. El virus es muy sensible al calor y se inactiva después de 30 minutos a 56°C. Sin embargo, el virus parece sobrevivir sin problema a la liofilización y cuando se liofiliza con un estabilizador de proteínas, puede sobrevivir en almacenamiento durante decenios a -70°C. El virus se inactiva con solventes como el éter y el cloroformo, ácidos (pH <5), bases (pH >10) y con la radiación ultravioleta y la luz visible. También es sensible a múltiples desinfectantes, como hipoclorito de sodio al 1%, alcohol al 70% y formol.

Figura 4. Diagrama de la partícula del virus del sarampión correlacionada con el mapa genético (según [12, 13])



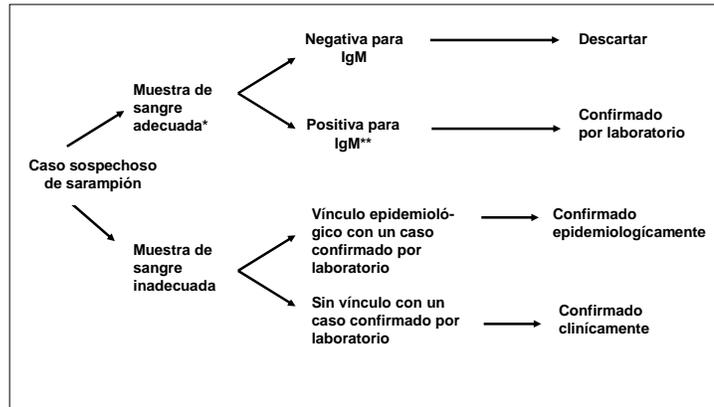
2.2.3 Diagnóstico clínico y de laboratorio

El sarampión es una enfermedad caracterizada por exantema maculopapular generalizado que dura 3 días o más, con fiebre de 38,3°C o más alta y tos, rinitis o conjuntivitis. Clínicamente, la detección de las manchas de Koplik y el progreso del exantema de la cabeza hacia el tronco y hacia afuera a las extremidades apoyan el diagnóstico de sarampión [7]. Sin embargo, la falta de especificidad de los signos prodrómicos y la existencia de casos leves hacen que los signos clínicos sean poco fiables como criterio único de diagnóstico del sarampión. En la medida en que disminuye la prevalencia de la enfermedad, muchos médicos carecen de experiencia en el reconocimiento del sarampión, lo cual aumenta la necesidad de métodos diagnósticos de laboratorio a fin de diferenciar el sarampión de otras enfermedades con características clínicas análogas. El diagnóstico erróneo del sarampión es, por ejemplo, más frecuente en los lactantes y es más probable la confirmación diagnóstica por el laboratorio de los casos asociados con un brote epidémico que de los casos esporádicos. El sarampión puede semejar a la infección por los virus de

la rubéola, el dengue, los virus ECHO, Coxsackie, parvovirus B19 y herpesvirus 6, así como a algunas infecciones bacterianas y rickettsias. Es más, existen otras enfermedades que pueden tener una presentación parecida, como la enfermedad de Kawasaki, el choque tóxico y las reacciones a los medicamentos.

En el laboratorio se puede usar uno de los siguientes métodos con el fin de confirmar los casos sospechosos de sarampión:

- Detección del anticuerpo IgM específico contra el sarampión en un laboratorio aprobado o certificado, EXCEPTO cuando la persona ha recibido una vacuna que contenga el antígeno del sarampión entre 8 días y 6 semanas antes de la obtención de la muestra y no existen pruebas de transmisión de sarampión en la comunidad ni ningún antecedente de viaje.
- Seroconversión de IgG o un aumento al cuádruple o más de la concentración del virus del sarampión (cuando la segunda muestra de suero se recoge como mínimo 10 días después de la primera, muestra aguda), EXCEPTO cuando la persona ha recibido una vacuna que contenga el antígeno del sarampión entre 8 días y 6 semanas antes de la obtención de la muestra y no existen pruebas de transmisión de sarampión en la comunidad, ni ningún antecedente de viaje. (NOTA: Las muestras séricas pareadas se deben analizar en paralelo).
- Detección del genoma del virus salvaje del sarampión en una muestra apropiada (no se realiza en forma sistemática con fines diagnósticos, pues su sensibilidad es inferior a la de las técnicas serológicas).
- Aislamiento del virus salvaje del sarampión de una muestra clínica (no se realiza en forma sistemática con fines diagnósticos, pues su sensibilidad es inferior a la de las técnicas serológicas).
- Sin embargo, en los países en fase de control de brotes epidémicos y en fase de eliminación, la clasificación final de los casos de sarampión se basa generalmente en el siguiente algoritmo [11]:



* Las pruebas ELISA de IgM son más sensibles entre los 4 y 28 días de iniciado el exantema, pero una muestra sérica única obtenida en el primer contacto con el sistema de atención de salud, en los primeros 28 días de iniciada la enfermedad, se considera adecuada para la vigilancia del sarampión

** Cuando la persona había recibido la vacuna en las 6 semanas que precedieron la obtención de la muestra, la búsqueda activa en la comunidad no detectó indicios de transmisión del sarampión y no existían antecedentes de viaje a zonas donde se sabe que circula el virus, se debe descartar el diagnóstico de sarampión.

2.3 Rubéola

2.3.1 Características epidemiológicas, infección y respuesta inmunitaria

El nombre de rubéola se deriva del latín que significa “rojizo”. Se consideró inicialmente como una variante del sarampión o de la escarlatina por lo cual se denominó “tercera enfermedad”. Solo en 1814 se describió por primera vez como una enfermedad diferente en las publicaciones médicas alemanas; de allí su nombre inglés común de “sarampión alemán”. En 1914, Hess postuló una causa viral con base en su trabajo con monos. En 1938 Hiro y Tosaka confirmaron el origen viral, cuando transmitieron la enfermedad a algunos niños usando lavados nasales filtrados provenientes de casos agudos. En 1941, un oftalmólogo australiano, Norman Gregg, comunicó la asociación entre cataratas congénitas y rubéola materna. Posteriormente, se confirmó el papel de la rubéola en el SRC, enfermedad que comprende catarata, cardiopatía y sordera [14].

La rubéola tiene una distribución mundial, con excepción de los países en los cuales la enfermedad se ha eliminado. Suele ocurrir con un patrón estacional (es decir, en las zonas templadas al final del invierno y en primavera), con epidemias cada 5 a 9 años. Sin embargo, la extensión y la periodicidad de las epidemias de rubéola son sumamente variables en los países desarrollados y en los países en desarrollo. El riesgo más alto de SRC se observa en los países donde las mujeres en edad fértil presentan altas tasas de susceptibilidad. Se han comunicado bajas tasas de susceptibilidad en estudios de poblaciones seleccionadas dentro de algunos países, pero estas tasas pueden reflejar variaciones locales y la extrapolación de tales resultados podría ocultar la ventaja considerable que representaría la introducción de la vacunación antirrubéolica en el país. [3]

La rubéola se transmite por el contacto con secreciones nasales o faríngeas de una persona infectada. Esto puede ocurrir como consecuencia de diseminación por el aire de las microgotas respiratorias, por contacto directo con una persona infectada o por contacto indirecto con artículos recientemente infectados. En recintos cerrados, como cuarteles militares y guarderías infantiles, todas las personas susceptibles expuestas pueden contraer la infección. Los lactantes con SRC excretan grandes cantidades de virus de la rubéola en sus secreciones faríngeas y en la orina y pueden constituir fuentes de transmisión.

La rubéola es moderadamente contagiosa, sobre todo en el período de aparición del exantema, pero es transmisible desde una semana antes, hasta 5 a 7 días o más después de iniciado el exantema (cuadro 2). Los lactantes con SRC pueden excretar virus hasta un año después del nacimiento. No existen pruebas de que el virus de la vacuna se pueda propagar a los contactos. (nota bibliográfica 131 p 985 Fields Virol Halstead et al, JAMA; 1971 215: 634-636)

Cuadro 2. Características clínicas de una infección típica por el virus de la rubéola. Evolución desde el comienzo de la enfermedad (según [6, 14, 15])

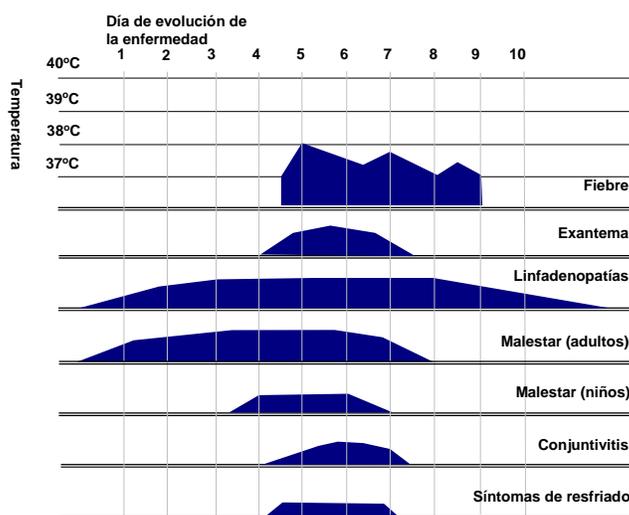
Día	Evento
0	El virus de la rubéola de las secreciones respiratorias de una persona infectada entra en contacto con la superficie epitelial de la nasofaringe de una persona susceptible. Se establece la infección localizada en el epitelio respiratorio y el virus se disemina a los ganglios linfáticos regionales.
1 a 22	Replicación viral en la nasofaringe y los ganglios linfáticos regionales.
3 a 8	Primeras pruebas de excreción nasofaríngea de los virus.
6 a 20	Viremia.
8 a 14	Infección establecida en la piel y otros focos.
10 a 17	Máxima viremia y viruria.
10 a 24	Máxima excreción nasofaríngea de virus (cerca de 3 días antes hasta 7 días después de la aparición del exantema).
17 a 19	La viremia disminuye y luego desaparece.

La rubéola afecta principalmente a los niños, a los adolescentes y a los adultos jóvenes. Aproximadamente 50% de infecciones por el virus de la rubéola son asintomáticas y no se detectan

a menos que se obtenga confirmación por el laboratorio. Cuando los síntomas existen, suelen ser muy leves. Los principales síntomas comprenden aumento del volumen de los ganglios linfáticos (linfadenopatía) y exantema maculopapular, que pueden estar precedidos de síntomas leves de resfriado común. Las linfadenopatías pueden aparecer entre 5 y 7 días antes del comienzo del exantema y hasta 2 días después. Si bien estos síntomas no son específicos de la rubéola, la linfadenopatía puede ser más pronunciada y durar más tiempo (varias semanas) en la rubéola que en otras enfermedades exantemáticas, como el sarampión [14].

Después de que el virus de la rubéola infecta la nasofaringe, se multiplica en el revestimiento de las vías respiratorias y en los ganglios linfáticos locales antes de pasar al torrente sanguíneo. La viremia empieza entre 5 a 7 días después de la infección y se disemina al resto del cuerpo, incluida la piel. Del mismo modo que en el sarampión, el exantema es mediado por una reacción inmunitaria y coincide con la aparición de anticuerpos específicos contra el virus. El virus se puede aislar de la nasofaringe desde una semana antes del comienzo del exantema hasta 2 semanas después de su aparición.

Figura 5. Características clínicas de una infección típica por el virus de la rubéola. Evolución desde el comienzo de la enfermedad (según [6, 13, 14])

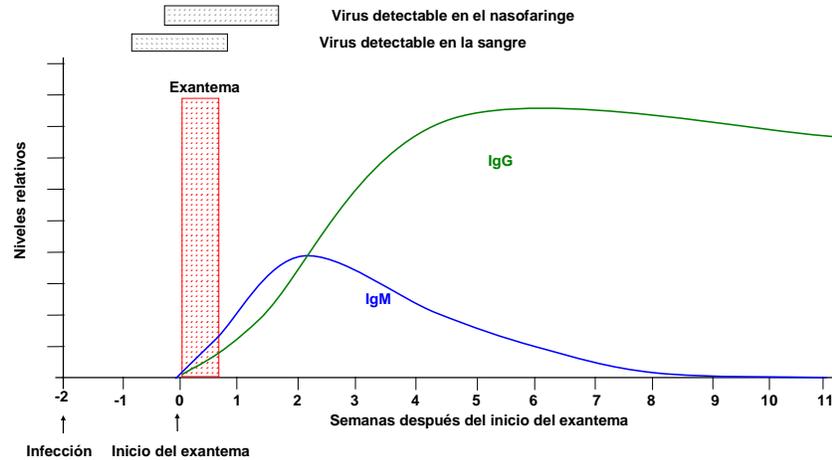


El período de incubación de la rubéola oscila entre 14 y 18 días pero puede durar de 12 a 23 días. Antes de la aparición del exantema ocurre un período prodrómico corto (1 a 5 días) en los adolescentes y en los adultos, pero no en los niños. En los niños, la erupción cutánea suele ser la primera manifestación. Los pródromos incluyen fiebre baja, cefalea, malestar general, anorexia, conjuntivitis leve, rinitis, dolor de garganta, tos y linfadenopatías de los ganglios suboccipitales, posarticulares y cervicales (figura 5). Entre 14 y 18 días después de la infección, aparece un exantema maculopapular (erupción cutánea rosada con manchas discretas). El exantema, que puede ser difícil de ver, comienza en la cara y el cuello y se disemina rápidamente hacia abajo al tronco y las extremidades. El exantema se desvanece después de 1 a 3 días y en ocasiones es pruriginoso. El dolor de las articulaciones y la artritis transitoria son poco frecuentes en los niños, pero ocurren con frecuencia en los adultos, especialmente en las mujeres.

Tras la infección por el virus de la rubéola se adquiere inmunidad humoral e inmunidad mediada por células. Los anticuerpos de tipo IgG e IgM se detectan entre 14 y 18 días después de la infección por el virus de la rubéola, alrededor del momento en que aparece el exantema (figura 6). Los anticuerpos IgM contra la rubéola disminuyen rápidamente y en general no se pueden detectar después de 2 meses, mientras que los anticuerpos IgG persisten. La respuesta linfocítica mediada

por células, específica de la rubéola, comienza una semana después de la respuesta humoral y persiste durante toda la vida.

Figura 6. Respuesta inmunitaria en un caso típico de infección por el virus de la rubéola (según [6, 13, 15])



Si bien la infección natural por el virus de la rubéola suele conferir una inmunidad de por vida, se han comunicado casos raros de reinfección, confirmados serológicamente después de una infección previa (o vacunación). También se han presentado casos de SRC después de una reinfección en mujeres embarazadas con inmunidad natural o generada por la vacuna, pero son extremadamente raros. Los anticuerpos maternos contra la rubéola protegen al recién nacido durante los primeros meses de vida y pueden modificar la respuesta inmunitaria si se vacuna a una edad temprana.

2.3.2 Síndrome de rubéola congénita e infección congénita por el virus de la rubéola

El SRC es la consecuencia más grave de la rubéola. Aparece como consecuencia de la infección del feto por el virus de la rubéola durante el primer trimestre del embarazo y puede ser causa de aborto espontáneo o inducido, mortinato o múltiples anomalías congénitas; pueden estar afectados prácticamente todos los órganos. La sordera es la manifestación más frecuente y a menudo la única del SRC. Cuando la infección fetal ocurre sin malformaciones congénitas se denomina infección congénita por el virus de la rubéola.

El riesgo de anomalías congénitas tras la infección materna por el virus de la rubéola varía del 10 al 90%. La gravedad y el tipo de anomalía dependen de la edad gestacional del feto en el momento de la infección. El período más peligroso son las 12 primeras semanas de gestación; las anomalías congénitas son raras como consecuencia de infecciones posteriores a las 20 semanas. La especificidad del órgano está dada en general por el momento de la infección intrauterina; sin embargo, la relación entre las anomalías fetales y el tiempo de la infección no siempre es clara. Una vez establecida la infección, ésta se puede diseminar a muchos órganos y las lesiones se pueden acumular. Las anomalías oftálmicas y cardíacas se suelen presentar con una infección ocurrida durante las 8 primeras semanas del embarazo, mientras que el daño cerebral y la sordera cuando la infección ocurre en las 18 primeras semanas del embarazo [6, 13, 14].

Aunque la vacunación antirrubéolica está contraindicada durante el embarazo, no se han notificado casos de SRC en más de 1.000 embarazadas susceptibles, que recibieron de forma inadvertida la vacuna al comienzo del embarazo. En una investigación de casi 19.000 embarazadas inadvertidamente vacunadas contra la rubéola en una gran campaña masiva, tampoco se

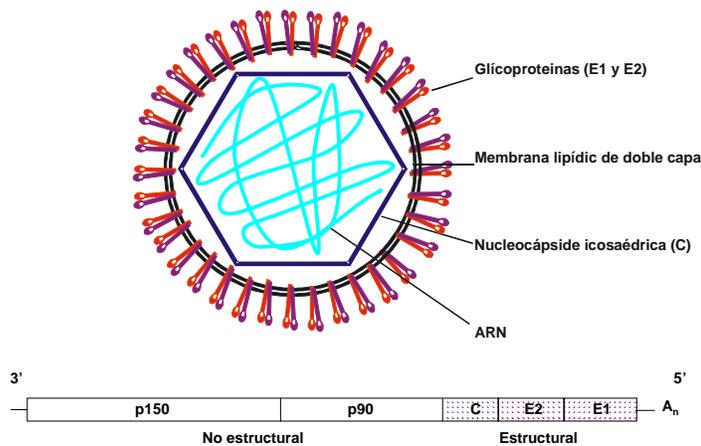
encontraron pruebas de casos de SRC (datos no publicados). Por lo tanto, la vacunación inadvertida contra la rubéola durante embarazo no constituye una indicación de aborto. [16]

2.3.3 Virus de la rubéola

El virus de la rubéola es el único miembro del género *Rubivirus* de la familia *Togavirus*. Se relaciona estrechamente con el género *Alfavirus*, al cual pertenecen los virus de la encefalitis equina del oeste y del este. A diferencia de la mayoría de togavirus, el virus de la rubéola NO es transmitido por artrópodos, sino que se adquiere por vía respiratoria. Este virus es casi esférico con un diámetro de 60 a 70 nm. Está compuesto por una nucleocápside icosaédrica que contiene un genoma monocatenar de ARN de polaridad positiva; el núcleo está rodeado por una cubierta lipídica compleja (*toga* = cubierta). El virus contiene tres proteínas estructurales, dos en la envoltura (E1 y E2) y una en el núcleo (cápside o proteína C) alrededor del ARN (figura 7). Las proteínas de la envoltura, E1 y E2, son glicoproteínas que existen como heterodímeros y se proyectan en forma de seis a ocho espículas de 8 nm en la superficie. E1 parece ser la molécula dominante de la superficie y se asocia con los epítopes neutralizantes y hemaglutinantes [17]. Sólo se conoce un serotipo del virus, pero los análisis del árbol filogénico, principalmente de la región que codifica E1, indican la existencia de por lo menos siete genotipos diferentes representados en dos clades [18]. No existe reacción cruzada con otros togavirus.

Figura 7 Diagrama de la partícula del virus de la rubéola correlacionado con el mapa genético (según [13, 17]).

Las glicoproteínas E1 y E2 existen como heterodímeros



El virus contiene un ARN de 9.762 nucleótidos. El extremo 5' del genoma posee una cofia y el extremo 3' una cola de poli (A). La síntesis y el procesamiento de las proteínas del virus de la rubéola tienen lugar a partir de precursores poliproteicos de alto peso molecular [17]. Ejemplos con información sobre la secuencia nucleotídica del virus de la rubéola se han depositado en el banco de datos EMBL/GenBank con los siguientes números de acceso: [M15240](#); M18901; y M32735.

El virus de la rubéola es relativamente termolábil, pero es más estable al calor que el virus del sarampión; se inactiva después de 30 minutos a 56°C, de 4 minutos a 70°C y de 2 minutos a 100°C. El virus se degrada rápidamente con la congelación convencional a -20°C, pero es estable a -60°C y menos cuando se liofiliza con estabilizadores. Cuando el virus se estabiliza con una proteína, es posible someterlo en forma reiterada a congelación y descongelación sin pérdida del título. Los solventes lipídicos, los ácidos y álcalis débiles y la luz ultravioleta inactivan el virus de la rubéola. Es también sensible a una amplia gama de desinfectantes y se inactiva en hipoclorito de sodio al 1%, etanol al 70% y formaldehído [14, 17, 19].

2.3.4 Diagnóstico clínico y de laboratorio

El diagnóstico de la rubéola basado exclusivamente en los signos y síntomas es poco fiable pues existen muchas otras causas de exantema que pueden imitar la infección por el virus de la rubéola y hasta 50% de las infecciones por este virus pueden ser asintomáticas [14]. En el laboratorio se pueden usar uno o varios de los siguientes métodos con el fin de aportar la prueba de la infección:

- Detección de anticuerpos de tipo IgM contra la rubéola en un laboratorio aprobado o certificado, EXCEPTO cuando la persona ha recibido una vacuna con componente antirrubéolico entre 8 días y 8 semanas antes de la obtención de la muestra y no existen pruebas de transmisión de rubéola en la comunidad ni antecedentes de viaje.
- Seroconversión de IgG o un aumento al cuádruple o más de la concentración de virus de la rubéola (cuando la segunda muestra de suero se recoge como mínimo 10 días después de la primera, muestra aguda), EXCEPTO cuando la persona ha recibido una vacuna que contenga un componente antirrubéolico entre 8 días y 8 semanas antes de la obtención de las muestras y no existen pruebas de transmisión de rubéola en la comunidad ni ningún antecedente de viaje. (NOTA: las muestras séricas pareadas se deben analizar en paralelo).
- Detección del genoma del virus salvaje de la rubéola en una muestra apropiada (no se suele realizar en forma sistemática con fines diagnóstico, pues es más difícil que las técnicas serológicas).
- Un cultivo positivo del virus de la rubéola (no se realiza en forma sistemática).

El virus de la rubéola se puede aislar de muestras nasales, sanguíneas, faríngeas, urinarias y de líquido cefalorraquídeo de casos de rubéola y de SRC. El virus se puede aislar de la faringe desde una semana antes hasta dos semanas después de la aparición del exantema. Si bien el aislamiento viral es diagnóstico de infección por el virus de la rubéola, este cultivo es laborioso y exige mano de obra considerable. Las muestras nasales, faríngeas, sanguíneas, urinarias y de líquido cefalorraquídeo se pueden usar, junto con tejidos de biopsia o de autopsia, en la confirmación por el laboratorio de los casos de SRC. Las pruebas serológicas ponen en evidencia la presencia de anticuerpos de tipo IgM contra la rubéola o la persistencia, más allá del tiempo previsto de su desaparición, de los anticuerpos IgG contra la rubéola transmitidos pasivamente por la madre. En algunos casos de SRC, los anticuerpos IgM se pueden encontrar hasta un año después del nacimiento; se ha detectado persistencia de anticuerpos IgG después de los 6 meses de edad en un 95% de los casos [14, 16].

Se han descrito resultados falsos positivos de las pruebas serológicas de IgM contra la rubéola, en personas con infecciones por parvovirus B19, con una prueba heterófila positiva para mononucleosis infecciosa o con un factor reumatoideo positivo [14, 20, 21].

2.4 Estrategia mundial de la OMS para el control del sarampión y prevención del SRC

2.4.1 Reducción de la mortalidad por sarampión y eliminación regional

En marzo de 2001, la OMS y UNICEF lanzaron conjuntamente su Plan estratégico 2001–2005 para la reducción de la mortalidad mundial por sarampión y su eliminación regional [22]. El objetivo primordial del plan fue reducir a la mitad el número de defunciones debidas al sarampión en el mundo a fines de 2005 (con respecto al número de defunciones en 1999). Las estrategias concebidas con miras a cumplir con esta meta consistieron en:

- obtener y mantener una cobertura muy alta con dos dosis de la vacuna antisarampionosa por conducto de servicios de vacunación regular de gran calidad;

- brindar una segunda oportunidad de vacunación antisarampionosa mediante las actividades suplementarias de vacunación a las poblaciones susceptibles, en conformidad con las metas nacionales de control del sarampión;
- reforzar la vigilancia del sarampión, integrando la información epidemiológica y de laboratorio; y
- mejorar el cuidado clínico de cada caso de sarampión.

El lanzamiento del plan estratégico conjunto ayudó a revitalizar las campañas mundiales, regionales y nacionales de reducción de la mortalidad por sarampión. Se instó enérgicamente a los países con alta mortalidad por sarampión a que aplicaran una estrategia integral sostenible de reducción de la mortalidad por esta enfermedad. La estrategia comprendía la obtención de una alta cobertura (> 90%) con la vacunación antisarampionosa rutinaria en cada distrito, procurando ofrecer a todos los niños “una segunda oportunidad” de vacunación antisarampionosa, por conducto de los servicios de vacunación regular o de actividades periódicas de vacunación suplementaria. Cuatro regiones de la OMS han adoptado metas regionales de eliminación del sarampión y las regiones de África y Asia Sudoriental centralizan su esfuerzo en la reducción de la mortalidad por sarampión.

Si bien la cobertura mundial con la vacunación antisarampionosa rutinaria presentó un aumento moderado entre 1999 (71%) y 2004 (76%), ésta varía en forma considerable en función de la región geográfica [2]. Ha aumentado la proporción de países que brindan a los niños una segunda oportunidad de vacunación antisarampionosa. En 2004, 168 países (88%) brindaban a los niños una segunda oportunidad, en comparación con 150 países (78%) en 2001 (no se cuenta con los datos previos a 2001). Entre 2000 y 2004, más de 215 millones de niños de 9 meses a 14 años de edad recibieron la vacuna antisarampionosa por conducto de las actividades periódicas de inmunización suplementaria en 36 países prioritarios de la OMS y el UNICEF. De los 36 países que condujeron estas actividades durante este período, 28 (78%) lo hicieron a escala nacional y 24 (67%) pertenecían a África subsahariana. Se observaron aumentos considerables de cobertura rutinaria en África subsahariana (de 49% a 65%) y en Asia Meridional (de 54% a 61%).

Estas actividades aceleradas han dado lugar a una reducción significativa de la estimación de defunciones por sarampión a escala mundial (cuadro 3). En términos generales, la mortalidad mundial por sarampión disminuyó en un 48% entre 1999 y 2004. Los mayores progresos se obtuvieron en la región de África donde la mortalidad por sarampión disminuyó en un 59% y representó un 67% de la reducción mundial durante este período.

Cuadro 3. Estimación de las defunciones por sarampión y porcentaje de reducción por región geográfica entre 1999 y 2004 (según [2])

Región geográfica	Estimación de muertes por sarampión en 1999	Estimación de muertes por sarampión en 2004	Cambio (% de disminución)	Contribución a la reducción mundial (%)
África subsahariana	530.000	216.000	-314.000 (59%)	75%
Asia Meridional	263.000	202.000	-61.000 (23%)	15%
Asia Oriental y Pacífico	68.000	32.000	-36.000 (53%)	9%
Otras	10.000	4.000	-6.000 (60%)	1%
Total mundial	871.000	454.000	-417.000 (48%)	100%

Dada la probabilidad de alcanzar en forma oportuna la meta de 2005, se propuso un objetivo más ambicioso de reducción de la mortalidad por sarampión en el proyecto Visión y Estrategia Mundial de Inmunización [23]. La nueva meta es una reducción del 90% de la mortalidad por sarampión en 2010, en comparación con el nivel de 2000. Existen los siguientes obstáculos mayores al cumplimiento de este nuevo objetivo. Primero, las actividades de reducción de la mortalidad por sarampión se deben ejecutar en varios países extensos con una alta carga de enfermedad por sarampión como Nigeria, India y Pakistán.

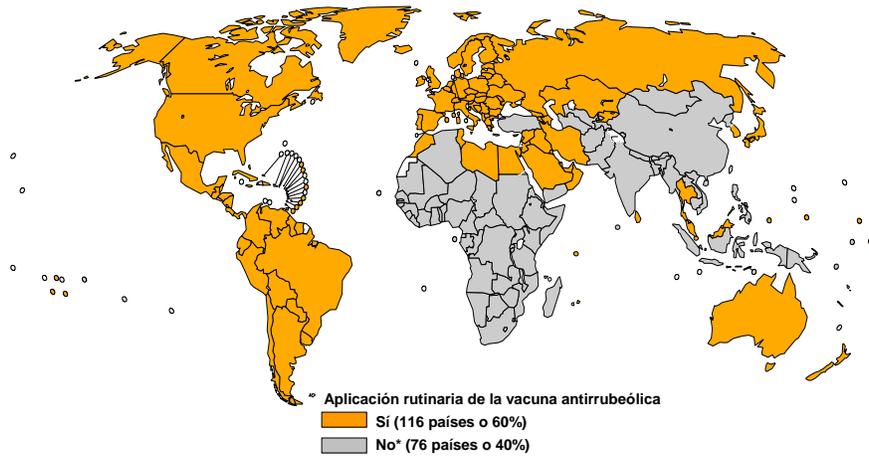
Segundo, con el fin de mantener los progresos en la reducción de muertes por sarampión en los 45 países prioritarios de alta mortalidad, es preciso fortalecer los esfuerzos tendientes a mejorar los sistemas de vacunación, con miras a vacunar contra el sarampión, como mínimo, al 90% de lactantes antes de su primer año de vida. Tercero, los países prioritarios deben seguir conduciendo actividades de inmunización suplementaria de seguimiento cada 3 ó 4 años hasta que sus sistemas de vacunación regulares sean capaces de brindar dos oportunidades de vacunación antisarampionosa a más del 90% de cada cohorte de nacimiento. Cuarto, se deben fortalecer los sistemas de vigilancia de la enfermedad a nivel del distrito, la provincia y el país, con el objeto de facilitar la vigilancia caso a caso, examinando las muestras clínicas de los casos sospechosos en los laboratorios que participan en la red mundial del sarampión y la rubéola [24]. Por último, se debe reforzar el tratamiento de los casos de sarampión, incluido la suplementación apropiada con vitamina A.

2.4.2 Prevención del SRC

Las vacunas existentes contra la rubéola, autorizadas internacionalmente, únicas o en combinación con vacunas contra la parotiditis y el sarampión han demostrado una gran eficacia en la prevención de la infección por el virus de la rubéola y del SRC en diferentes partes del mundo. La OMS recomienda el uso de la vacuna contra la rubéola en todos los países que cuentan con programas eficientes de inmunización infantil, con una cobertura de rutina sostenida superior al 80%, donde se considere una prioridad de salud pública la reducción o eliminación del SRC y donde se puedan movilizar recursos con el fin de ejecutar una estrategia apropiada. [15] La carga de enfermedad mundial por el SRC ya se encuentra bien caracterizada; ahora se debe dar prioridad a la promoción de la lucha contra este síndrome y a su prevención.

Los países que desean prevenir el SRC están ahora vacunando a las adolescentes y a las mujeres en edad fértil; la población destinataria precisa es función del perfil de susceptibilidad, de la aceptabilidad cultural y de la factibilidad operativa. Los resultados más rápidos se pueden obtener mediante campañas masivas dirigidas a las mujeres en edad fértil; sin embargo, el control total del SRC ha resultado difícil utilizando como única estrategia la vacunación dirigida. La vacunación por conducto exclusivo de los servicios regulares, sin una orientación hacia las mujeres en edad fértil, conduce a un retraso durante el cual pueden ocurrir e incluso aumentar los casos de SRC [25]. La adopción de la vacunación sistemática contra la rubéola ha aumentado progresivamente, hasta alcanzar 116 de los 192 países (60%) en 2004 (figura 8). Todos los países que emprenden la eliminación de la rubéola deben procurar que las mujeres en edad fértil estén inmunizadas y que la cobertura rutinaria en los niños se sostenga por encima del 80% [15].

Figura 8 Países que aplican la vacuna antirrubéolica en los esquemas regulares de vacunación en 2004



*Uzbekistán introdujo la vacuna antirrubéolica en la región de Navoi en 2004.

Fuente: Base de datos de OMS/IVB, 2005. 192 Estados Miembros de la OMS. Datos a septiembre de 2005. Fecha de la diapositiva: 14 de septiembre de 2005

Los límites y las denominaciones presentados en este mapa no implican, por parte de la Organización Mundial de la Salud, juicio alguno en cuanto a la condición jurídica de ningún país, territorio, ciudad o zona ni de sus autoridades, ni respecto al trazado de sus fronteras o límites. Las líneas discontinuas en el mapa representan en forma aproximada las fronteras sobre las cuales quizá no exista todavía pleno acuerdo.
© OMS 2005. Derechos reservados



2.4.3 Control integrado del sarampión y de la rubéola

Hasta principios de 2006, cuatro Regiones de la OMS habían adoptado las metas de eliminación del sarampión y dos (Américas y Europa) habían adoptado metas de eliminación de la rubéola y del SRC. La OMS recomienda que los países que emprendan la eliminación del sarampión aprovechen la ocasión para eliminar al mismo tiempo la rubéola, mediante el uso de la vacuna combinada antisarampionosa y antirrubéolica o la vacuna triple viral, en sus programas de inmunización infantil y también en las campañas masivas. [15] Una estrategia integrada de vacunación, destinada a alcanzar las metas de control de la rubéola y el sarampión, brinda la oportunidad de mejorar la eficiencia del programa; la pertinencia de esta oportunidad varía, no obstante, en diferentes circunstancias y en diferentes momentos. Las actividades previas de vacunación, los aspectos logísticos y los recursos disponibles pueden hacer que una estrategia integrada no sea factible o sea inapropiada en algunos países en el momento actual. Las oficinas regionales de la OMS suministran información y recomendaciones sobre los requisitos y la adecuación de una estrategia integrada contra el sarampión y la rubéola.

3. Importancia y función del laboratorio en el control del sarampión y la prevención del SRC

3.1 Función del laboratorio en la vigilancia epidemiológica del sarampión y la rubéola

A medida que aumenta el nivel del control del sarampión y la rubéola, el laboratorio desempeña una función más importante en la vigilancia de estas enfermedades. Se sabe que en la fase de eliminación, la vigilancia basada en el reconocimiento clínico de los casos es inexacta y que la confirmación por el laboratorio de los casos sospechosos, aunada al genotipado de las cepas de virus circulantes, es fundamental para una vigilancia eficaz. El laboratorio ejerce dos funciones principales en la vigilancia del sarampión y la rubéola.

- Monitoreo y verificación de la transmisión del virus:
 - confirmación de los brotes epidémicos: confirmar el diagnóstico clínico en las primeras etapas de un brote;
 - confirmación de los casos: confirmar o descartar todos los casos sospechosos de sarampión o rubéola;
 - identificación de las cepas de virus del sarampión y de la rubéola y caracterización genética de los aislados virales.
- Monitoreo del perfil de susceptibilidad de una población:
 - determinación de la distribución etaria de la susceptibilidad al sarampión y a la rubéola, con el fin de facilitar la evaluación de la necesidad de campañas de vacunación;
 - evaluación del impacto de las campañas masivas.

A cada fase consecutiva del programa de control del sarampión y la rubéola corresponden actividades específicas de vigilancia (cuadro 4). Los laboratorios no pueden cumplir con sus funciones actuando aisladamente, sino que se deben organizar en una red de apoyo que suministre al programa la información precisa y en forma eficiente.

Cuadro 4. Función del laboratorio en el control y la eliminación del sarampión y la rubéola

Fase de control del sarampión y la rubéola	Función del laboratorio
Control	Confirmar los casos iniciales durante los brotes epidémicos mediante detección de anticuerpos de tipo IgM. Analizar las cepas de virus salvajes de casos seleccionados con el fin de establecer la información genética de referencia
Prevención y eliminación de brotes epidémicos	Confirmar el diagnóstico clínico de los casos sospechosos a fin de ayudar en la detección temprana de la circulación del virus Analizar las cepas de virus salvajes de casos seleccionados con el fin de definir los genotipos circulantes, trazar las vías de transmisión, completar la cartografía mundial de los genomas de los virus del sarampión y la rubéola y determinar el impacto de las estrategias de control En circunstancias especiales, establecer la seroprevalencia en la población y contribuir con el pronóstico de brotes epidémicos

3.2 Estructura y actividades de la red de laboratorios en la vigilancia del sarampión y la rubéola

La instauración de una red internacional de laboratorios como apoyo a las actividades de control del sarampión y la rubéola comporta cinco objetivos principales:

- preparar protocolos de diagnóstico de laboratorio del sarampión y la rubéola y prestar la ayuda necesaria en función de la evolución del programa;
- establecer mecanismos de referencia y apoyo destinados a los laboratorios regionales y nacionales en el diagnóstico del sarampión, la rubéola y otras enfermedades exantemáticas;
- proporcionar recursos e instalaciones con vistas a la capacitación del personal de laboratorios regionales y nacionales;
- ofrecer una fuente de materiales de referencia y asesoramiento técnico con el propósito de poner a punto pruebas diagnósticas más eficaces y controlar su calidad;
- servir como banco de cepas de los aislados de virus del sarampión y la rubéola con fines de epidemiología molecular y como fuente de los sueros de referencia para el control de calidad.

La experiencia ha mostrado que la red de laboratorios se debe organizar al mismo tiempo que los programas regionales de control y de eliminación y debe contar con personal idóneamente capacitado y equipos y reactivos suficientes. La red mundial de laboratorios de la OMS para el sarampión y la rubéola está organizada en cuatro niveles. (Figura 9):

- Laboratorios mundiales especializados

Estos son los laboratorios que han fijado las normas técnicas del diagnóstico de laboratorio. Tienen a su cargo los laboratorios del sarampión y la rubéola en todas las regiones y países.

- Laboratorios regionales de referencia

Estos son centros de excelencia en cada región, capaces de asumir responsabilidades internacionales. Servirán como laboratorios de referencia a los laboratorios nacionales de los países vecinos y como laboratorios nacionales en sus propios países. Cada región de la OMS puede contar hasta con tres o cuatro laboratorios regionales de referencia.

- Laboratorios nacionales

Estos laboratorios mantienen el vínculo más cercano con los encargados de los programas nacionales. Examinan las muestras de los casos sospechosos mediante pruebas ELISA de IgM y notifican directamente a los encargados del programa. El número de laboratorios nacionales dependerá de las prioridades epidemiológicas y de los recursos existentes.

- Laboratorios subnacionales

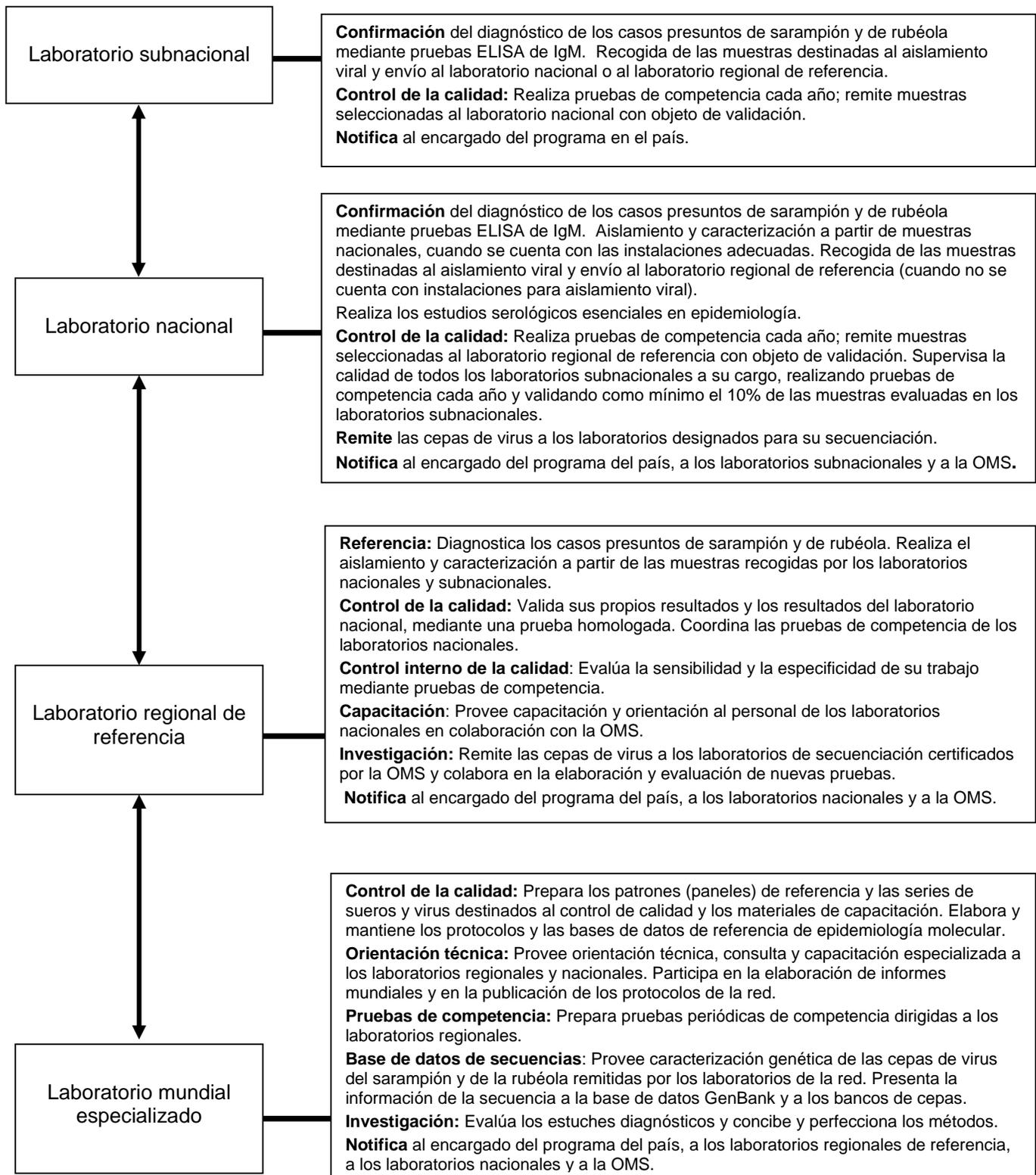
Debido al gran tamaño de la población y a las considerables dificultades logísticas de algunos países, el examen de las muestras de sarampión puede sobrepasar la capacidad de un laboratorio nacional único. En estos países, se pueden establecer además laboratorios subnacionales en el primero o segundo nivel administrativo.

A fin de cumplir con los objetivos descritos en la figura 9, la red de laboratorios de sarampión y rubéola debe contar con:

- vínculos conocidos con los programas de inmunización y departamentos de vigilancia en el ministerio de salud;
- capacidad confirmada de realizar las pruebas en forma precisa y oportuna;
- personal científico y técnico adecuadamente capacitado;

- instalaciones de laboratorio y recursos suficientes con el fin de sufragar los gastos de funcionamiento;
- equipo apropiado para la realización de los análisis serológicos sistemáticos; y
- capacidad de comunicación con el programa nacional de control, la OMS y demás laboratorios en la red.

Figura 9. Red de laboratorios para actividades de vigilancia del sarampión y la rubéola en cada nivel



No se exige que los laboratorios individuales emprendan toda la gama de tareas aquí enumeradas, pero deben cumplir funciones específicas de acuerdo a las necesidades de los programas nacionales y regionales y de su propio nivel dentro de la red. La supervisión de los laboratorios que participan en la red se lleva a cabo por medio de pruebas periódicas de competencia en técnicas seleccionadas y evaluaciones de desempeño mediante el mecanismo de acreditación.

3.3 Coordinación de la red

La OMS coordina la red de laboratorios de sarampión y rubéola, con base en la experiencia adquirida al establecer la red mundial de laboratorios de poliomielitis. Cada una de las regiones de la OMS cuenta con un coordinador de laboratorios regionales encargado de los laboratorios dentro de su región. Cada una de las regiones trabaja conjuntamente con el coordinador mundial de laboratorios en la sede de la OMS, en Ginebra. La coordinación se logra mediante la transmisión periódica de resultados, solicitudes y consultas, y la retroalimentación de análisis, comentarios y asesoramiento técnico. La OMS coordina también la adquisición y distribución de materiales de laboratorio y reactivos estandarizados esenciales, destinados a países seleccionados.

Una red de laboratorios eficaz y eficiente depende de la buena comunicación tanto dentro de la red como con los programas de control de enfermedades y de inmunización. Se han elaborado formularios estandarizados de remisión y de notificación, a fin de conseguir la transmisión de toda la información esencial sobre los pacientes. El formato y el ritmo de la notificación de resultados a nivel nacional y regional se basarán en las normas mundiales, pero los detalles se acordarán en conjunto con los encargados de los programas de control de las enfermedades y de inmunización.

Se ha concebido un sistema de supervisión de los indicadores de desempeño en el terreno y en los laboratorios, que incluye pruebas anuales de competencia y acreditación de los laboratorios y está ahora en fase de implementación. Los virólogos y los epidemiólogos a todos los niveles deben establecer mecanismos de intercambio periódico de información, con el fin de supervisar y evaluar los indicadores de desempeño del sistema de vigilancia. Las ventajas de llevar a cabo reuniones periódicas de coordinación y de intercambio de información están plenamente establecidas y se ha propuesto que los representantes de los laboratorios especializados mundiales y de los laboratorios regionales de referencia se reúnan por lo menos una vez al año. Los representantes de los laboratorios nacionales deben realizar reuniones con sus homólogos de los programas de control por lo menos una vez al mes y participar en las reuniones regionales cada año.

3.4 Epidemiología molecular y genotipificación

3.4.1 Sarampión

La caracterización molecular de los virus del sarampión es un componente importante de la vigilancia, ya que proporciona un método de determinación del origen geográfico y de rastreo de las vías de transmisión de un virus. La caracterización molecular ofrece asimismo una herramienta valiosa de medición de la eficacia de los programas de control y eliminación del sarampión y provee información que puede servir en la confirmación de la interrupción de transmisión endémica del sarampión. La OMS recomienda realizar la vigilancia de los virus durante todas las fases del control del sarampión y ampliar las actividades de vigilancia virológica de manera que proporcionen una descripción precisa de la distribución mundial de los genotipos del virus del sarampión. La red mundial de laboratorios de sarampión y rubéola de la OMS presta apoyo a la vigilancia virológica.

La OMS ha designado dos bancos de cepas de virus del sarampión: la sección de virus del sarampión de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los EUA y el Organismo de Protección Sanitaria del Reino Unido, a fin de adquirir, analizar, almacenar y

distribuir las cepas representativas. Se recomienda a los laboratorios de sarampión que remitan sus cepas de virus a un banco de cepas, donde éstas se verificarán y se presentarán al GenBank, y la información del genotipo se transmitirá a la base de datos del sarampión y la rubéola de la OMS. Cuando los laboratorios pueden secuenciar los virus, la información de la secuencia también se debe presentar al GenBank y a los bancos de cepas, y la información sobre el genotipo se debe comunicar a la OMS. Los datos de la secuencia de todas las cepas de referencia y de las cepas salvajes depositadas estarán accesibles en los bancos de cepas de la OMS o por conducto del GenBank. Las muestras clínicas también se pueden remitir para análisis a los laboratorios regionales de detección viral designados por la OMS. Cuando la detección del virus es exitosa, se secuenciarán las cepas representativas y se incorporarán a las bases de datos del banco de cepas y al GenBank. Los bancos de cepas de la OMS pueden prestar asesoramiento sobre las licencias de importación y otros requisitos, con el fin de facilitar el envío de cepas y de muestras clínicas.

En 1998, la OMS publicó las directrices de una nomenclatura uniforme destinada a designar los virus salvajes del sarampión y describir los genotipos. Este informe proporcionó también recomendaciones sobre los métodos de laboratorio utilizados en la caracterización genética. La secuencia de los 450 nucleótidos que codifican los últimos 150 aminoácidos del extremo COOH de la nucleoproteína, constituye la cantidad mínima de datos necesarios a la determinación del genotipo de un virus del sarampión. Los datos de la secuencia se pueden obtener a partir de un aislado viral o mediante la amplificación del genoma del virus, directamente del ARN extraído de una muestra clínica. Es preciso obtener las secuencias completas del gen de la hemaglutinina (1854 nucleótidos) a partir de cepas representativas de países específicos o de brotes epidémicos extensos [10].

Cuando se sospecha la aparición de un nuevo genotipo, es necesario obtener un aislado viral y la secuencia completa de la hemaglutinina, además de la secuencia de la nucleoproteína. Con el fin de analizar los datos de secuencia obtenidos a partir de los aislados virales o de las muestras clínicas, la OMS estableció el uso de secuencias de referencia estandarizadas específicas de cada genotipo designado. En 2001, 2003 y 2005 se actualizaron las recomendaciones de la OMS, de suerte que se tenga en cuenta la identificación de nuevos genotipos obtenidos mediante la vigilancia virológica ampliada [10, 26, 27, 28, 29]. Los genotipos propuestos se deben designar usando la letra del clade en letra minúscula (por ejemplo, d10). Los términos clade y genotipo se usan con el fin de describir las características genéticas de los virus salvajes del sarampión. En el campo de la epidemiología molecular, las designaciones de genotipo constituyen la unidad taxonómica operativa y los clades indican la relación genética entre los diversos genotipos.

En la actualidad, según información publicada e inédita, existen ocho clades designados de A a H. Dentro de estos ocho clades, se han reconocido 23 genotipos (cuadro 5). Algunos clades contienen un solo genotipo, en cuyo caso la designación del genotipo coincide con el nombre del clade. Otro clades, como el D, contienen múltiples genotipos, designados por la letra del clade (en mayúscula) y el número del genotipo. Los genotipos, E, F, G1, D1, seguirán catalogados como inactivos, pues no se ha aislado ningún virus representativo de estos genotipos en los últimos 15 años. Además, el genotipo B1 de África central, originalmente detectado a principios de los años ochenta, también se debe considerar inactivo con la advertencia que la vigilancia regional de las cepas del sarampión es insuficiente. El genotipo B2 se catalogó antes como inactivo; sin embargo, recientemente se aislaron virus con el genotipo B2 de pacientes con sarampión en la República Centroafricana, Angola, la República Democrática del Congo y Rwanda y también de casos importados en Sudáfrica y Alemania. Antes de estas detecciones recientes, la última identificación del genotipo B2 tuvo lugar a comienzos de los años ochenta en Gabón. El genotipo B2 se designa ahora como un genotipo activo (cuadro 5). Probablemente, los virus de genotipo B2 han estado circulando continuamente en algunas partes de África central pero no se habían detectado debido a una vigilancia virológica inadecuada.

Cuadro 5. Cepas de referencia que se deben utilizar en el análisis genético de los virus del sarampión de tipo salvaje [10]

Genotipo	Estado ^a	Cepas de referencia ^b	Número de acceso del gen de la hemaglutinina	Número de acceso del gen de la nucleoproteína
A	Activo	Edmonston-wt.USA/54	U03669	U01987
B1	Inactivo	Yaounde.CAE/12.83 "Y-14"	AF079552	U01998
B2	Activo	Libreville.GAB/84 "R-96"	AF079551	U01994
B3	Activo	New York.USA/94	L46752	L46753
		Ibadan.NIE/97/1	AJ239133	AJ232203
C1	Activo	Tokyo.JPN/84/K	AY047365	AY043459
		Maryland.USA/77 "JM"	M81898	M89921
C2	Activo	Erlangen.DEU/90 "WTF"	Z80808	X84872
		Bristol.UNK/74 (MVP)	Z80805	D01005
D2	Activo	Johannesburg.SOA/88/1	AF085198	U64582
D3	Activo	Illinois.USA/89/1"Chicago-1"	M81895	U01977
D4	Activo	Montreal.CAN/89	AF079554	U01976
		Palau.BLA/93	L46757	L46758
D5	Activo	Bangkok.THA/93/1	AF009575	AF079555
D6	Activo	New Jersey.USA/94/1	L46749	L46750
D7	Activo	Victoria.AUS/16.85	AF247202	AF243450
		Illinois.USA/50.99	AY043461	AY037020
D8	Activo	Manchester.UNK/30.94	U29285	AF280803
D9	Activo	Victoria.AUS/12.99	AY127853	AF481485
D10	Activo	Kampala.UGA/51.00/1	AY923213	AY923185
E	Inactivo	Goettingen.DEU/71"Braxator"	Z80797	X84879
F	Inactivo	MVs/Madrid.SPA/94 SSPE	Z80830	X84865
G1	Inactivo	Berkeley.USA/83	AF079553	U01974
G2	Activo	Amsterdam.NET/49.97	AF171231	AF171232
G3	Activo	Gresik.INO/17.02	AY184218	AY184217
H1	Activo	Hunan.CHN/93/7	AF045201	AF045212
H2	Activo	Beijing.CHN/94/1	AF045203	AF045217

^a Genotipos activos aislados en los 15 últimos años.

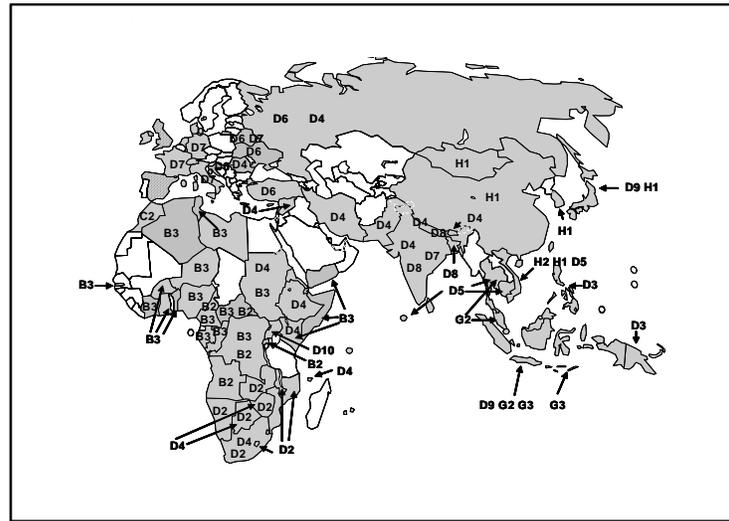
^b Nombre de la OMS. Los demás nombres que se han usado en las publicaciones científicas aparecen entre comillas.

A excepción del genotipo F, todos los genotipos cuentan con una cepa de referencia propia. Las cepas de referencia se escogieron con el fin de representar el primer aislamiento viral de cada genotipo. La designación de nuevos genotipos se debe basar en la información de la secuencia de los aislados virales y no en las secuencias obtenidas exclusivamente del material clínico. Varias publicaciones han referido dos conglomerados dentro del genotipo B3; se incluye un representante de cada conglomerado. Dado que la designación del genotipo D7 se basó en la secuencia de virus aislados en Australia a fines de los años ochenta, se ha agregado una segunda cepa de referencia con miras a representar las secuencias D7 más contemporáneas [27, 28].

El Reino Unido y España (rayados en la figura 10) notificaron genotipos múltiples debidos a casos importados. Es de anotar que en el continente americano y en Australia (ausentes del mapa) se ha eliminado el sarampión y se han detectado genotipos múltiples en los casos importados. El genotipo D7 es el genotipo notificado con mayor frecuencia en Europa occidental.

Los países no sombreados no han transmitido ninguna notificación.

Figura 10. Distribución mundial de los genotipos del virus del sarampión entre 1995 y 2006 en las regiones de la OMS que no han eliminado aún el sarampión (según WER Nov 05)



Convención de nomenclatura de las cepas

Los nombres de las cepas suministran información esencial en la interpretación de los datos moleculares. Puesto que los datos de secuencia pueden provenir de virus aislados en cultivo celular o del ARN extraído directamente de muestras clínicas, las cepas o las secuencias se deben designar ya sea como:

- MVi: aislado (i del inglés *isolate*) de virus del sarampión en cultivo celular; o como
- MVs: secuencia de virus del sarampión derivada de ARN extraído de muestras clínicas.

El nombre de la cepa o de la secuencia debe comportar además información sobre:

- la ciudad de aislamiento, escribir el nombre completo o la abreviatura (necesario);
- el país, usar la designación ISO de 3 letras (necesario);
- la fecha de obtención de la muestra por semana epidemiológica (1 a 52) y por año (necesario);
- el número del aislado cuando se presenta más de uno por semana (facultativo);
- el genotipo (facultativo inicialmente, pero necesario una vez que se ha completado la secuencia de por lo menos 450 nucleótidos del gen de la nucleoproteína);
- la designación especial de las secuencias derivadas de casos de encefalitis con cuerpos de inclusión del sarampión “MIBE” (por su nombre en inglés: *measles inclusión body encephalitis*) o de casos de panencefalitis esclerosante subaguda “SSPE” (por su nombre en inglés: *subacute sclerosing panencephalitis*) (facultativo).

Los siguientes ejemplos ilustran la nomenclatura:

MVi/NewYork.USA/03.98/ 2 [D2];

MVs/London.GBR/17.97 [G3] SSPE.

3.4.2 Rubéola

Una reunión de la OMS en septiembre de 2004 trató sobre la normalización de una nomenclatura que describa las características genéticas del virus salvaje de la rubéola y sobre la aplicación de protocolos uniformes de análisis genético [18]. La vigilancia del virus de la rubéola constituye una

parte importante de su vigilancia durante las fases de control y eliminación; la meta de la vigilancia debe ser obtener una secuencia viral de las muestras representativas de cada brote epidémico durante la fase de control o de cada cadena de transmisión durante la fase de eliminación. La red mundial de laboratorios de sarampión y rubéola de la OMS apoyará las iniciativas destinadas a obtener aislados de los virus salvajes de la rubéola circulantes y facilitará su remisión a los laboratorios designados, donde se realizará el análisis genético. Se solicita a los laboratorios que cumplan las mismas recomendaciones a fin de compartir la información sobre las muestras y la información genética como es el caso con el sarampión (véase sección 3.4.1). Los dos bancos de cepas de virus del sarampión designados por la OMS, se ocupan también de los virus de la rubéola.

La mayoría de los estudios genéticos de los virus salvajes de la rubéola se ha conducido mediante secuenciación completa o de porciones de la región que codifica la proteína E1 de la envoltura. En la actualidad, se utilizan en la caracterización genética diferentes porciones (ventanas) de la región que codifica E1, pero la OMS recomienda en los estudios de rutina de epidemiología molecular una ventana de 739 nucleótidos, entre los nucleótidos 8731 y 9469.

Los principales grupos filogénicos del virus de la rubéola, que difieren en 8 a 10% de la secuencia nucleotídica, se pueden separar en dos clades. En el cuadro 6 se enumeran los virus de referencia de siete grupos interclades, denominados genotipos (1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 2A y 2B), con un genotipo común provisional (1a). En la reunión, se clasificaron como provisionales otros dos genotipos (2c y 1g) [18]. Un genotipo provisional (letra minúscula) se convertirá en un genotipo establecido (letra mayúscula) cuando se obtengan los virus de referencia y se aclaren las relaciones filogénicas entre el genotipo provisional y los demás genotipos. El genotipo 1a se consideró provisional porque la filogenia de este grupo de virus era compleja y mal conocida. Las propuestas de nuevos genotipos se deben presentar a la consideración de los bancos de cepas de la OMS del Organismo de Protección Sanitaria en Londres y de los Centros para el Control de Enfermedades y Protección en Atlanta.

Cuadro 6. Cepas de referencia en el análisis genético de los virus de la rubéola de tipo salvaje [18]

Genotipo	Cepas de referencia ^a	Nombre actual ^b	Número de acceso
1a	RVi/BEL/63	Cendehill BEL 63 ^c	AF188704
	RVi/Con.USA/61	HPV77 US 61 ^c	M30776
	RVi/Toyama.JPN/67	TO-336 WT JP 67	AB047330
1B	RVi/ISR/75[1B]	I-9 IS 75	AY968207
	RVi/ISR/88[1B]	I-34 IS 88	AY968209
	RVi/ISR/79[1B]	I-13 IS 79	AY968208
1C	RVi/Cal.USA/91[1C]	BUR US 91	AY968212
	RVi/SLV/02[1C]	QUI ELS 02	AY968211
	RVi/PAN/99[1C]	P-31 PAN 99	AY968217
1D	RVi/Cal.USA/97[1D]CRS	SAL-CA US 97	AY968206
	RVi/Tokyo.JPN/90[1D]CRS	NC JP 90	AY968214
	RVi/Saitama.JPN/94[1D]	SAI-1 JP 94	AY968216
1E	RVi/Shandong.CHN/02[1E]	T14 CH 02	AY968210
	RVi/MYS/01[1E]	M-1 MAL 01	AY968221
1F	RVi/Shandong.CHN/00[1F]	TS10 CH 00	AY968213
	RVi/Anhui.CHN/00[1F]	TS 38 CH 00	AY968215
2A	RVi/Beijing.CHN/79[2A]	BRD1 CH 79	AY258322
	RVi/Beijing.CHN/80[2A]	BRD2 CH 80 ^c	AY258323
2B	RVi/TelAviv.ISR/68[2B]	I-11 IS 68	AY968219
	RVi/Wash.USA/16.00[2B]	TAN IND 00	AY968220
	RVi/Anhui.CHN/00/2[2B]	TS34 CH 00	AY968218
Vacuna ^d	RVi/USA/64	RA27/3 US 64 ^c	L78917

^a Cepas denominadas usando la nueva convención recomendada por la OMS. No se cuenta con la información completa de algunas cepas

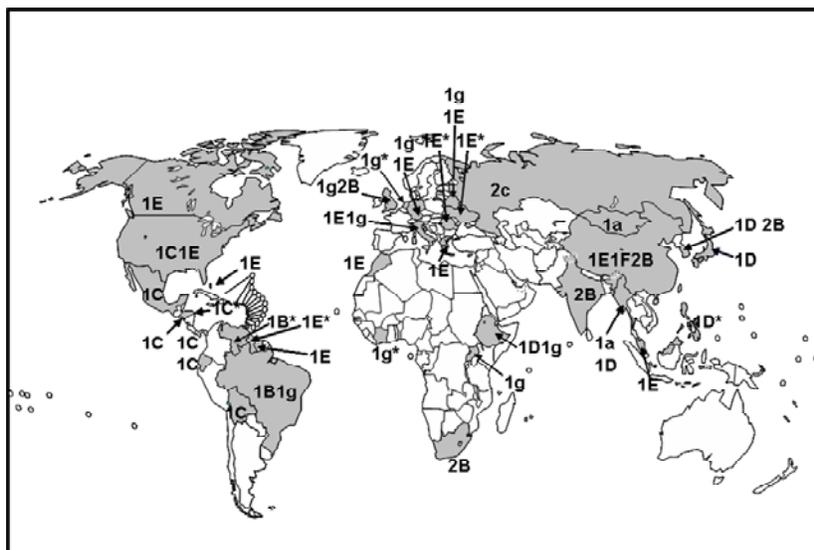
^b Cepas denominadas usando los identificadores antiguos o publicados anteriormente

^c Virus vacunal atenuado cuyo virus salvaje original se ha perdido

^d Se considera que el genotipo de este virus es 1a.

Aunque se acepta que la vigilancia del virus de la rubéola es insuficiente, en figura 11 se presenta la información accesible sobre la distribución mundial de genotipos de virus de la rubéola durante 11 años entre 1995 y 2005. El genotipo 1a era el genotipo hallado con más frecuencia en todo el mundo antes de 1984 y ahora ha desaparecido casi completamente, excepto en Mongolia y Myanmar. El último genotipo 1a detectado en el resto del mundo provino de Canadá en 1985. Se ha observado que los genotipos 1B, 1C, 1D y 1F tienen una distribución limitada: 1B se encontró en Europa y a lo largo de la costa oriental de América del Sur, 1C en Centroamérica y a lo largo de la costa occidental de América del Sur; 1D en países asiáticos y se encontró un virus del genotipo 1D en Etiopía; el genotipo 1F se encontró en China. El genotipo 1C se observó en un brote epidémico único en el Japón y se pensó que había sido importado de un brote simultáneo presente en América, aunque no existen datos epidemiológicos directos que respalden esta afirmación. El genotipo 1D se encontró anteriormente en Canadá y los Estados Unidos, pero su última notificación data de 1987 en Canadá y de 1988 en los Estados Unidos. El genotipo 1E, se identificó por primera vez en 1997 y ahora parece ser un genotipo con distribución mundial. El genotipo 1g necesita más estudio, sin embargo, en la figura 11 se presentan los países en los cuales se ha encontrado este genotipo provisional. Los virus del clade 2 se han encontrado solo en África, Asia y Europa. El genotipo 2A se aisló sólo en China en 1979 y en 1980 y no ha reaparecido desde entonces. El genotipo 2B se distribuye más ampliamente que los demás genotipos del clade 2. El genotipo 2c se ha hallado sólo en la Federación de Rusia.

Figura 11. Distribución de los virus de la rubéola entre 1995 y 2005



Los datos de genotipos representan un resumen de la información de varios laboratorios, accesible a partir de julio de 2005. Los países no sombreados no han presentado ninguna notificación.
 * Virus caracterizados tras su importación a otro país.
 Durante este período, ciertos países redujeron la rubéola autóctona a niveles bajos o la eliminaron (por ejemplo, Canadá, Cuba, el Reino Unido y los Estados Unidos de América).

4. Recogida de muestras, envío, recibo y procesamiento

La correcta sincronización de la toma de muestras con el tiempo de aparición de los signos clínicos es importante en la interpretación de los resultados y en la inferencia de una conclusión exacta. Las muestras destinadas al diagnóstico por anticuerpos IgM del sarampión y la rubéola y por detección viral se deben recoger en función de la fase de control o eliminación de estas enfermedades (cuadro 7). El personal idóneo de laboratorio y de epidemiología debe acordar con antelación la cantidad y el tipo de muestras y los mejores lugares de recogida de las mismas, con fines de detección viral. En condiciones ideales, las muestras destinadas a la detección del virus se deben recoger en forma simultánea con las muestras de diagnóstico serológico y de confirmación del virus del sarampión o de la rubéola como causa del brote epidémico. Como cada tipo de muestra exige condiciones diferentes, la decisión sobre la clase de muestra depende de los recursos locales y de los medios de transporte y capacidad de almacenamiento. Esto precisa una estrecha cooperación entre los virólogos, los epidemiólogos y los clínicos. Se necesita una planificación detallada, designación de las responsabilidades y capacitación.

Cuadro 7. Requisitos mínimos de las pruebas serológicas para el sarampión y la rubéola y para el aislamiento viral, en función de la fase

Fase	Función del laboratorio	Situación epidemiológica	Muestra para la detección del anticuerpo de tipo IgM contra el sarampión y la rubéola	Muestra para la detección del virus
Control	Confirmar los casos iniciales durante brotes	Caso aislado	No	No
	Analizar las cepas de virus salvajes de casos seleccionados a fin de caracterizar genéticamente los virus del sarampión circulantes	Brote epidémico	Sí Muestras de 5 a 10 casos desde comienzos del brote hasta la confirmación de la causa	Sí De 5 a 10 muestras cerca del comienzo y del final del brote epidémico
Prevención de brotes epidémicos y eliminación	Confirmar el diagnóstico clínico de todos los casos sospechosos a fin de detectar en forma temprana la circulación del virus	Caso aislado	Sí De todos los casos sospechosos	Sí De todos los casos sospechosos
	Analizar las cepas salvajes de virus y supervisar su distribución y circulación a fin de evaluar el impacto de las estrategias de vacunación	Conglomerado de enfermedad exantemática febril	Sí De 5 a 10 casos iniciales a fin de confirmar el brote, de casos en los distritos recién infectados y de casos cerca del final del brote epidémico	Sí 5 a 10 muestras; se pueden recoger más muestras en los distritos recién infectados y cerca del final del brote

Dado que es más probable aislar el virus cuando se recogen las muestras en los primeros 3 a 5 días de iniciado el exantema, no se debe retrasar la recogida de muestras destinadas a la detección del virus con el objeto de esperar la confirmación de un caso sospechoso por parte del laboratorio.

4.1 Documentación de las muestras recogidas

Es necesario obtener información sobre todas las muestras recogidas para análisis, usando preferentemente un formulario de solicitud de laboratorio uniforme. En el [anexo 9.1](#) se presenta un modelo de este formulario. Un formulario adecuado debe contar como mínimo con la siguiente información:

- número de identificación única (usando el formato acordado);
- número interno de laboratorio;
- nombre del paciente (en español);
- edad (o fecha de nacimiento en notación ordinaria);
- provincia (o región);
- pueblo o municipio;
- código del país (asignado por Oficina Regional de la OMS);
- fecha de la última vacunación contra el sarampión, la rubéola o ambas;
- fecha de aparición del exantema;
- ¿cumple el paciente con la definición de caso?
- tipo de muestra;
- fecha de obtención de la muestra; y
- fecha del envío de la muestra al laboratorio.

4.2 Muestras de suero destinadas a la detección de anticuerpos

Una prueba diagnóstica ideal del sarampión y la rubéola es aquella que:

- requiere una muestra no invasiva;
- requiere sólo una muestra;
- puede usar una muestra recogida en el momento del primer contacto con el paciente;
- es altamente sensible (que detecta una alta proporción de casos verdaderos) y específica (tiene un bajo grado de falsos positivos);
- tiene un alto valor predictivo positivo (proporción de los casos diagnosticados como sarampión o rubéola que corresponden verdaderamente a sarampión y rubéola); y
- se realiza sin dificultad a nivel local y proporciona resultados exactos y rápidos, sobre los cuales se puede basar la ejecución de las medidas de control.

Las pruebas recomendadas por la red de laboratorios de sarampión y rubéola de la OMS son las pruebas ELISA de detección de anticuerpos de tipo IgM específicos del virus. Estas pruebas se pueden adquirir comercialmente y sus resultados muestran una muy buena correlación con la capacidad que tienen las pruebas de inhibición de la hemaglutinación y las reacciones de neutralización de placas, de detectar un aumento al cuádruple de la concentración de IgG en muestras de suero pareadas. Desde el punto de vista técnico, las pruebas de IgM de sarampión y rubéola reúnen una serie ensayos de detección que se practican ahora en los laboratorios en todo el mundo, con los cuales se alcanza una competencia aceptable, aun con poca capacitación de laboratorio. La OMS recomienda que los laboratorios comuniquen los resultados de la prueba de IgM de los casos endémicos, en un máximo de 7 días después de la recepción de las muestras. Sin embargo, durante los brotes epidémicos o en situaciones en las que la rápida notificación de los resultados contribuirá a la implementación de una respuesta por parte del programa de control, un laboratorio competente debe estar en capacidad de proporcionar los resultados en 24 horas (incluso

4 a 5 horas en algunos laboratorios) después de la recepción de la muestra en el laboratorio. Dada la necesidad de un diagnóstico diferencial en la enfermedad exantemática febril, en muchos países se propone, en la práctica, contar con una batería de pruebas serológicas similares para tres o más enfermedades exantemáticas de las más frecuentes en una zona dada (por ejemplo, sarampión, rubéola y dengue).

4.2.1 Momento oportuno de recogida de la muestra sanguínea para la detección de IgM de sarampión y rubéola

La sensibilidad de las pruebas ELISA de IgM de sarampión y de rubéola es mayor entre 4 y 28 días después de la aparición del exantema, pero con fines de vigilancia, se considera adecuada una muestra sérica única, obtenida en el momento del primer contacto con el sistema de atención de salud, en los primeros 28 días de la erupción cutánea. Sin embargo, en las primeras 72 horas de iniciado del exantema, hasta 30% de las pruebas de IgM específica contra el sarampión pueden dar resultados falsos negativos (hasta 50% de pruebas de IgM específica contra la rubéola pueden dar resultados falsos negativos en las primeras 72 horas) [30, 31]. En los brotes epidémicos, cuando se han recogido de 5 a 10 muestras, el diagnóstico individual no es primordial, pero en los casos esporádicos, **puede** ser necesaria una segunda muestra en las siguientes circunstancias:

- cuando la primera muestra de sangre destinada a la prueba de IgM se recogió en los primeros 4 días de iniciado el exantema y es negativa por ELISA. El laboratorio puede solicitar una segunda muestra con el fin de repetir la prueba de IgM, dada la probabilidad de falsos negativos en las muestras tempranas;
- cuando la prueba ELISA de IgM da reiteradamente un resultado dudoso; y
- cuando el médico tiene que establecer un diagnóstico definitivo en un paciente determinado, con un resultado inicial negativo.

Se puede extraer una segunda muestra destinada a la prueba de IgM en cualquier momento entre 4 y 28 días después de la aparición del exantema. La recogida de una segunda muestra de 10 a 20 días después de la primera, permitirá al laboratorio repetir la prueba de IgM y además estudiar el aumento de la concentración de anticuerpos de tipo IgG, cuando se cuenta con un método cuantitativo adecuado.

4.2.2 Recogida y procesamiento de las muestras de suero y sangre seca en papel filtro

La muestra de sangre se debe extraer por punción venosa a un tubo estéril (será suficiente una muestra de 5 ml en niños mayores y adultos y de 1 ml en lactantes y niños pequeños) o cuando corresponda, por punción del dedo o del talón a un papel filtro y se debe rotular con la identificación del paciente y la fecha de obtención. La sangre completa se puede almacenar entre 4°C y 8°C hasta 24 horas antes de separar el suero, pero no se debe congelar.

La muestra de sangre se deja coagular y luego se centrifuga a 1.000 x g durante 10 minutos a fin de separar el suero. Cuando no se cuenta con una centrífuga, se conserva la sangre en un refrigerador hasta la retracción completa del coágulo (no más de 24 horas). El suero se debe extraer cuidadosamente a fin de evitar incluir glóbulos rojos, y se trasladada asépticamente con una pipeta fina a un vial estéril, rotulado con el nombre o el identificador del paciente, la fecha de obtención y el tipo de muestra.

La muestra de sangre seca en papel filtro se deja secar al aire y luego se conserva en una bolsa o envase hermético, de ser posible con un material desecante. Aunque las muestras de sangre seca son estables a temperatura ambiente durante un cierto tiempo, es preferible conservarlas a 4°C, si es posible, hasta cuando se puedan enviar al laboratorio.

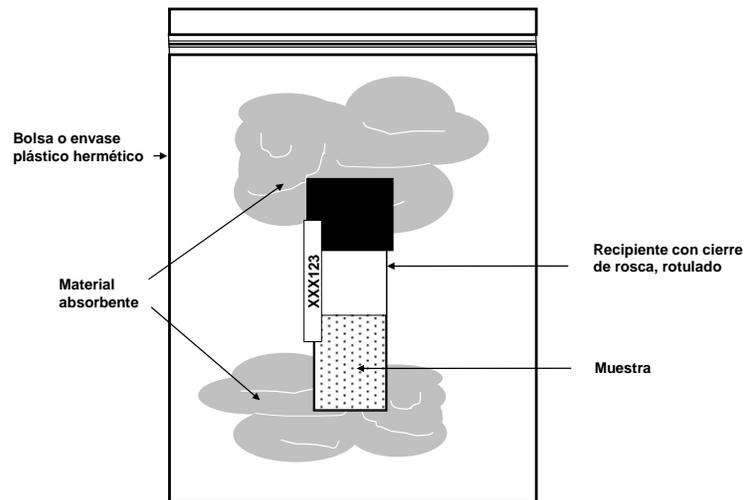
4.2.3 Almacenamiento y envío de las muestras de suero

El suero se debe almacenar entre 4°C y 8°C hasta su envío o durante un máximo de 7 días. Cuando se conservan durante períodos más largos, las muestras de suero deben congelarse a -20°C o menos y transportarse al laboratorio de análisis sobre un bloque refrigerante congelado. La congelación y descongelación iterativas pueden tener efectos perjudiciales sobre la estabilidad de los anticuerpos de tipo IgM. Como regla general, las muestras de suero se deben enviar al laboratorio cuanto antes; no se debe retrasar el envío buscando aumentar el número de muestras.

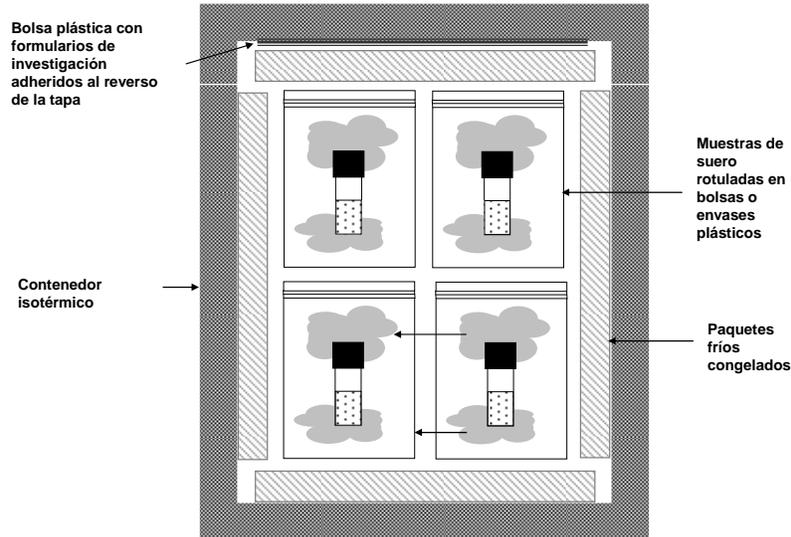
Las muestras de suero, en sus viales individuales rotulados y sellados, se deben colocar en bolsas o envases plásticos herméticos, con materiales absorbentes como algodón hidrófilo que absorban la totalidad del contenido en caso de fugas (figura 12). Las bolsas herméticas con muestras se deben conservar en contenedores isotérmicos. El rótulo de la muestra y el formulario de investigación de cada una se colocan en otra bolsa plástica y se adhieren bien a la superficie interna de la parte superior del contenedor isotérmico (figura 13). Cuando se emplean paquetes fríos (congelados), estos se distribuyen en el fondo y a los lados del contenedor isotérmico. Luego, se colocan las muestras en el centro con más paquetes fríos por encima. Quienes recogen la muestra y el laboratorio del análisis determinan juntos la fecha de envío. Una vez terminados los preparativos, se informa al destinatario sobre la fecha y el tipo de transporte. Consúltese el anexo 9.5 sobre los detalles adicionales.

Las muestras de suero recibidas para estudio de IgM se deben analizar cuanto antes, después de su recepción en el laboratorio. El almacenamiento a corto plazo de las muestras séricas (de 1 a 7 días) se hace a 4°C. Los sueros deben permanecer a -20°C o menos, cuando se almacenan a largo plazo.

**Figura 12. Embalaje de las muestras de suero.
Muestra individual en una bolsa o envase hermético.**



**Figura 13. Embalaje de las muestras de suero.
Muestras múltiples en un contenedor isotérmico**



4.3 Muestras destinadas al aislamiento viral

El laboratorio y los epidemiólogos deben acordar con antelación el tipo y el número de muestras más apropiados con el fin de aislar el virus. Lo ideal es que las muestras se recojan simultáneamente con las muestras de sangre para el diagnóstico serológico y la confirmación del virus del sarampión o de la rubéola como la causa del brote. Como cada tipo de muestra exige condiciones diferentes, la decisión sobre el tipo de muestras dependerá de los recursos y de los medios de transporte y capacidad de almacenamiento.

Se recomienda que las muestras clínicas (hisopos nasofaríngeos o de garganta, aspirados nasales o 10 a 50 ml de orina) destinadas al aislamiento viral del sarampión se obtengan tan pronto como sea posible después de la aparición del exantema. Cuando se obtiene una muestra de suero con fines diagnósticos, ésta se debe recoger durante el primer contacto con un caso sospechoso de sarampión. El aislamiento viral del sarampión es más exitoso cuando las muestras se recogen entre el primer día del exantema y 3 días después de su aparición; sin embargo, el virus puede estar presente hasta el quinto día del exantema. El virus de la rubéola se puede detectar en las secreciones nasofaríngeas desde unos pocos días antes de la aparición de la erupción cutánea hasta varios días después. Ambos virus son sensibles al calor y su infectividad disminuye notablemente cuando las muestras no se conservan en frío. Es importante transportar las muestras al laboratorio con paquetes fríos, lo más pronto posible después de su obtención.

4.3.1 Muestras nasofaríngeas destinadas al aislamiento viral del sarampión y la rubéola

Las muestras nasofaríngeas destinadas al aislamiento viral se deben recoger lo antes posible, después de la aparición del exantema, cuando el virus está presente en las concentraciones más altas. Las muestras nasofaríngeas se pueden obtener de diversas maneras (a fin de aumentar la recuperación de virus):

- **Aspirados nasales:** se recogen instilando unos pocos mililitros de solución salina estéril en la nariz con una jeringa acoplada a un tubo plástico fino, y recuperando el

líquido en un tubo de centrífuga con cierre de rosca que contiene el medio de transporte de virus.

- **Lavado de garganta:** se obtiene pidiendo al paciente que haga gárgaras con un volumen pequeño de solución salina estéril y se recoge el líquido en el medio de transporte de virus.
- **Hisopos nasofaríngeos y orofaríngeos:** se obtienen frotando firmemente la encrucijada nasofaríngea y la pared posterior de la faringe con torundas de algodón estériles a fin de desprender las células epiteliales. Los hisopos se colocan en medio estéril de transporte de virus, en tubos con cierre de rosca rotulados.

Las muestras nasofaríngeas se deben refrigerar y enviar con paquetes fríos (entre 4°C y 8°C) de manera que lleguen al laboratorio en un plazo de 48 horas. Cuando no se pueden tomar las provisiones necesarias para un envío rápido, se agitan los hisopos en el medio a fin de eluir las células y luego se retiran. El medio o aspirado nasal se centrifuga a $500 \times g$ (aproximadamente 1.500 rpm) durante 5 minutos, preferentemente a 4°C y se resuspende el sedimento en medio de cultivo celular. El sedimento en suspensión y el sobrenadante se deben almacenar por separado a -70°C y enviar al laboratorio de análisis sobre hielo (entre 4 y 8°C) de manera que lleguen en un plazo de 48 horas o preferentemente, en nieve carbónica en viales con cierre de rosca bien sellados.

Las muestras de lavados nasales o de garganta y los hisopos que están en un volumen muy pequeño (de 1 a 4 ml) se pueden congelar a -70°C y cuando no se cuenta con congeladores de baja temperatura, se conservan a 4°C hasta su envío. Se deben evitar los ciclos reiterados de congelación y descongelación y la congelación a -20°C (temperatura ordinaria de los congeladores) pues los cristales de hielo pueden destruir el virus. Cuando no se cuenta con un medio de almacenamiento a -40°C o -70°C, se recomienda conservar la muestra en el frigorífico (a 4°C).

Cuando se recibe en el laboratorio la muestra como material congelado en 2 a 3 ml de medio de cultivo celular o en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS), se puede almacenar congelada, como llega. Cuando se recibe el tubo original con hisopo, se recupera el material del hisopo agregando 2 ml de medio esencial mínimo de Dulbecco, se mezcla el contenido en un agitador vorticial y se deja reposar durante una hora permitiendo la elución del virus. Luego, se extrae la máxima cantidad de líquido del hisopo prensándolo contra la pared del tubo. Cuando existe mucho residuo, se elimina centrifugando el tubo. La muestra líquida se debe almacenar a -70°C.

4.3.2 Muestra de orina destinada al aislamiento y detección del virus del sarampión

El mayor rendimiento en el aislamiento viral del sarampión se obtiene cuando las muestras se recogen lo más pronto después de la aparición del exantema y hasta 5 días después. Es preferible obtener la primera orina de la mañana. Se deben recoger entre 10 y 50 ml de orina en un envase estéril que se conserva entre 4°C y 8°C hasta su centrifugado. El virus del sarampión en los casos agudos está presente en las células que se han descamado en las vías urinarias. El virus se concentra centrifugando la orina y el sedimento de células se resuspende en un medio apropiado de transporte de virus. La orina **NO** debe **congelarse** antes haber concentrado la muestra.

Las muestras completas de orina se pueden enviar en recipientes bien cerrados, a 4°C, pero es preferible centrifugarlas en un plazo de 24 horas después de su obtención. La centrifugación se realiza a $500 \times g$ (aproximadamente 1.500 rpm) durante 5 a 10 minutos, preferentemente a 4°C. El sobrenadante se debe desechar y el sedimento se resuspende en 2 a 3 ml de medio estéril de transporte de virus, medio de cultivo celular o de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS). El sedimento resuspendido se puede almacenar a 4°C y enviar en un plazo de 48 horas a un

laboratorio de sarampión de referencia. Otra posibilidad es congelar el sedimento a -70°C en medio de transporte de virus y enviarlo en hielo seco en un vial con cierre de rosca bien sellado.

4.3.3 Muestra de sangre destinada al aislamiento y detección del virus del sarampión

Con el fin de separar las células mononucleares para aislamiento viral, se extrae la sangre mediante punción venosa a un tubo estéril con EDTA (ácido etilendiamino tetracético). Se recomienda un volumen sanguíneo mínimo de 5 ml. La fracción de plasma se puede usar en la determinación de anticuerpos IgM específicos contra el sarampión. El tubo se debe rotular con el número de identificación del paciente y la fecha de la extracción. Las muestras de sangre se pueden enviar en tubos bien cerrados a 4°C . La sangre entera con EDTA se debe procesar a fin de aislar el virus en un plazo de 48 horas después de la extracción y no se debe congelar en ningún momento hasta esta etapa.

Al llegar la muestra al laboratorio, se separan las células mononucleares de la sangre. El método más conveniente es un producto comercial diseñado para separar los linfocitos de la sangre periférica mediante centrifugación (por ejemplo, el medio de separación de linfocitos de *Organon Teknika*). Después de diluir la sangre con solución salina amortiguada con fosfato en una proporción de 1:1, ésta se dispone cuidadosamente en capa sobre 2 ml de medio de separación de linfocitos en un tubo de ensayo. El tubo se centrifuga a 2.000 rpm durante 30 minutos a 20°C en un rotor de cubos pivotantes y sin activar el freno de la centrifuga. Las células mononucleares deben formar una banda blanca o gris sobre el sedimento de glóbulos rojos. Esta capa se extrae cuidadosamente con una pipeta en un tubo de centrifuga limpio y se lava con 10 a 15 ml de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS). Se debe formar un sedimento compacto de células mononucleares y resuspenderlas luego en un pequeño volumen (de 1 a 2 ml) de medio esencial mínimo de Dulbecco. Se recomienda que cada muestra se divida como mínimo en dos tubos. Las células mononucleares resuspendidas se almacenan a -70°C .

4.4 Muestras destinadas a la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa

Es frecuente detectar los virus del sarampión y la rubéola en las muestras descritas anteriormente mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RCP-TR), hasta 3 o 4 días más allá del periodo de aislamiento viral al comienzo del exantema. Toda muestra recogida y transportada al laboratorio con fines de aislamiento viral se puede usar en la prueba de RCP-TR. Sin embargo, aunque existen algunas publicaciones sobre aislamiento viral de la rubéola de células mononucleares de sangre periférica, estas células no suelen ser una buena fuente de ARN del virus de la rubéola. Además, las muestras recogidas usando otras opciones de muestreo (secreciones bucales y sangre seca, véase luego), se pueden usar en el análisis de RCP-TR cuando se obtienen en los primeros 7 días de iniciado el exantema y se transportan al laboratorio en las condiciones apropiadas. Nótese que los dispositivos de muestreo de secreciones bucales que emplean un conservante con el fin de estabilizar la IgM (como OraSure™) NO se pueden usar en la recogida de muestras destinadas a la RCP-TR.

4.5 Otras técnicas de obtención de muestras (muestras de sangre seca y de secreciones bucales)

La extracción de muestras de sangre, en particular en los niños, no siempre es acogida con entusiasmo y no siempre se puede mantener la cadena de frío durante el transporte de las muestras al laboratorio. Recientemente se han validado dos estrategias con miras a utilizarlas en la red de

laboratorios de sarampión y rubéola de la OMS, que podrían llegar a ser herramientas útiles en el programa del sarampión y la rubéola: el uso de muestras de gotas de sangre seca en papel filtro y de secreciones bucales [32-41]. Las gotas de sangre seca se han utilizado en una variedad de estudios epidemiológicos como una alternativa al suero. En esta forma el anticuerpo es estable y con ello el método es particularmente valioso donde no se cuenta con cadena de frío. Últimamente, esta técnica se ha aplicado con éxito en casos de sarampión y cada vez se acumula más evidencia de que la técnica funcionará también en los casos de rubéola [41,42]. La recogida de muestras de secreciones bucales se ha usado con éxito en casi toda la vigilancia de sarampión, rubéola y parotiditis realizada en el laboratorio en el Reino Unido desde principios de la década de 1990. Las muestras de secreciones bucales se obtienen sin dificultad, no es un método cruento y es más aceptable para la población. Su aplicación permite que los trabajadores de campo obtengan un muestreo más completo de los casos sospechosos.

Las secreciones bucales (sin estabilizador de suero) y las gotas de sangre seca en papel filtro también se pueden usar en la detección de los genomas virales, mediante la RCP-TR. Así, se tiene la posibilidad adicional de hacer el estudio del virus y de la respuesta de anticuerpos en la misma muestra. Nota: Las muestras de secreciones bucales ofrecen una mayor sensibilidad en la detección de ácidos nucleicos que las muestras de sangre seca.

4.5.1 Obtención, almacenamiento y procedimientos de envío de la sangre seca

Los requisitos de obtención, almacenamiento y transporte de las muestras de sangre seca son mínimos. Se limpia con alcohol el dedo del participante o el talón en el caso de los niños muy pequeños y luego se pincha con una microlanceta estéril de uso único. Se recogen hasta cuatro gotas de sangre total sobre papel filtro estandarizado (por ejemplo, papel Whatman de cromatografía número 3 o Schleicher y Schuell número 903). El papel filtro debe estar marcado, ya sea a mano, en impresora láser o en fotocopiadora en un formato uniforme, con círculos de 14 a 15 mm dentro de los cuales se aplicarán las gotas de sangre, además el espacio para el nombre, la edad y el sexo del paciente y un espacio donde se escribe el número de laboratorio o de la muestra. En la figura 14 se presenta el modelo de un formato adecuado de tarjeta de papel filtro destinada a la recogida de la muestra de sangre.

Figura 14. Modelo del formato de tarjeta de recogida de muestras de sangre seca en papel filtro

Nombre:.....
Fecha de nacimiento...../...../..... Sexo M/F
Fecha de obtención...../...../.....

Número de laboratorio

○ ○ ○ ○

El papel filtro se debe dejar secar completamente (al menos 60 minutos) antes de guardarlo en una bolsa de almacenamiento. Los papeles de filtro se pueden colocar en un sujetador de portaobjetos o un dispositivo similar durante este tiempo. El secado estabiliza la IgM y disminuye las posibilidades de contaminación microbiana. Cada papel filtro se debe envolver individualmente, preferentemente en una bolsa plástica con cierre hermético con el fin de prevenir una posible contaminación cruzada y protegerlo del polvo y la humedad. Cuando es posible, se incluye en la bolsa un paquete con desecante. Las muestras de sangre en el papel filtro, cuando están completamente secas, no están sometidas a la reglamentación sobre mercancías peligrosas de la Asociación del Transporte Aéreo Internacional (IATA) y se pueden despachar sin documentación especial desde el punto de recogida hasta el laboratorio. Si bien no es necesario mantener las muestras refrigeradas o congeladas durante el transporte, se aconseja almacenarlas en un lugar fresco y enviarlas cuanto antes.

Al llegar al laboratorio, las gotas de sangre seca se almacenan en bolsas plásticas individuales con cierre hermético rotuladas o en otro envase hermético a 4°C hasta su análisis. El almacenamiento a largo plazo se hace a -20°C, con un paquete de desecante. Por razones de seguridad, las gotas de sangre seca se consideran siempre como material potencialmente infeccioso y sólo se manipulan con guantes.

4.5.2 Obtención, almacenamiento y procedimientos de envío de las secreciones bucales

El exudado de las fisuras localizadas en el límite entre las encías y los dientes contiene bajas concentraciones de IgM [37]. Se han diseñado diversos dispositivos de recolección con hisopos (como el Oracol® y el OraSure®), con el fin específico de recoger estas secreciones de la boca. Los hisopos se utilizan como un cepillo de dientes y se deben frotar contra la encía hasta que estén bien impregnados, lo cual toma generalmente un minuto. El hisopo húmedo se coloca dentro del tubo plástico transparente de transporte, el cual cuenta con un espacio exterior donde se escribe el nombre del paciente, datos sobre el mismo y la fecha de recogida. Algunos dispositivos incluyen el medio de transporte de virus en el tubo plástico, otros permiten transportarlo tal cual. Se deben respetar las instrucciones específicas proporcionadas por el fabricante del dispositivo. Cuando la temperatura ambiente diaria está por debajo de 22°C, las muestras se envían al laboratorio en un plazo de 24 horas. A temperaturas más altas, las muestras se deben conservar en un frigorífico hasta su envío al laboratorio sobre hielo. En general, no se considera que las muestras representen un riesgo biológico y se pueden despachar sin documentación especial desde el punto de recogida hasta el laboratorio.

Las secreciones bucales se extraen de los hisopos cuanto antes, a su recepción en el laboratorio. En la recogida y almacenamiento de las muestras de secreciones bucales recogidas con el dispositivo Oracol® se aplica el siguiente procedimiento:

- Agregar 1 ml de medio de transporte de virus (véase anexo 9.5) al tubo que contiene el hisopo;
- agitar el hisopo manualmente o con un agitador vorticial de mesa durante 20 segundos hasta que el medio de transporte forme espuma;
- extraer el hisopo del tubo frotándolo contra la pared, a fin de extraer la mayor cantidad posible de líquido;
- invertir el hisopo y colocarlo de nuevo en el tubo de manera que su espuma rosada quede ahora en la parte superior del tubo. Colocar de nuevo la tapa;
- centrifugar a 2.000 rpm durante 5 minutos;
- desechar el hisopo usando pinzas;

- las secreciones bucales así extraídas se recuperan del tubo, usando a una pipeta Pasteur. Distribuir las en dos tubos, uno para la prueba de IgM y otro para la RCP-TR; y
- almacenar la muestra de IgM a 4°C y las muestras de RCP-TR a -20°C o menos, hasta su análisis.

4.6 Precauciones generales de seguridad al recibir las muestras

Al llegar al laboratorio, las cajas o los paquetes de envío se deben desempacar inmediatamente en una zona designada, equipada con un recipiente de desechos, toallitas impregnadas de alcohol y toallas de papel. La seguridad de los técnicos de laboratorio es la principal preocupación; cuando existe, se podría usar un gabinete de bioseguridad de clase II con el fin de limitar la exposición del personal de laboratorio a posibles patógenos [43]. Cuando no se cuenta con gabinetes de bioseguridad se puede usar una mesa de trabajo limpia. Este espacio de trabajo debe tener una superficie que se pueda limpiar sin problema con desinfectantes comunes de laboratorio (alcohol al 70%, solución de hipoclorito de sodio, solución de glutaraldehído al 2%, etc.) y debe estar ubicado lejos de las zonas destinadas a otras actividades de laboratorio. Es preferible que el desembalaje y el registro de las muestras lo lleven a cabo dos personas: una consigna los datos, mientras la otra, usando guantes, se encarga de abrir el paquete, verifica que los envases con las muestras no estén rotos y que no haya fugas ni contaminación de los documentos adjuntos. Todo documento contaminado se coloca temporalmente en el gabinete de bioseguridad, hasta cuando se consigne la información manualmente en una hoja limpia. Los documentos contaminados se manipulan de la misma manera que los desechos infecciosos. Se debe conservar una copia de todos los documentos relativos al envío, en particular los permisos. Se recomienda que cada laboratorio establezca procedimientos normalizados de apertura de los paquetes y registro de las muestras.

5. Diagnóstico de laboratorio del sarampión y la rubéola

La detección de la IgM específica del sarampión o la rubéola en el suero es la prueba estándar para el diagnóstico rápido de estas enfermedades en el laboratorio. La prueba de IgM se realiza en general usando kits comerciales de ensayo inmunoenzimático. Algunas pruebas comerciales de IgM del sarampión y la rubéola aplican un método indirecto. Este método requiere el bloqueo de los anticuerpos de tipo IgG y del factor reumatoideo mediante un tratamiento previo, con lo cual obtiene un rendimiento óptimo. En el diagnóstico del sarampión y la rubéola se han desarrollado ensayos basados en la captura de IgM. Estas pruebas no requieren la remoción de los anticuerpos IgG, y se consideran un poco más específicas y técnicamente más sencillas de realizar, que los ensayos inmunoenzimáticos indirectos de detección de anticuerpos de tipo IgM. En este capítulo se describen las pruebas indirectas y los ensayos de captura.

La detección de un aumento de la IgG específica en muestras séricas recogidas durante la fase aguda y de convalecencia ya no se utiliza en forma rutinaria en el diagnóstico de la infección aguda por los virus del sarampión y la rubéola, pero se puede usar con el propósito de confirmar la infección. Las pruebas de IgG implican la obtención de dos muestras, con un intervalo de 10 a 30 días y también se pueden utilizar en la confirmación de casos esporádicos con resultados de IgM positivos o dudosos en países que se encuentran en la fase de eliminación. En los estudios de seroprevalencia, realizados como apoyo a las actividades de control del sarampión y la rubéola, se realiza en forma característica la detección cuantitativa de IgG mediante ensayo inmunoenzimático en una muestra única de suero.

Los sistemas de detección directa del sarampión y la rubéola mediante RCP-TR se están generalizando pero, aunque se han establecido métodos estandarizados, todavía no se ha definido un protocolo único. Los métodos bien definidos y ampliamente utilizados en la detección del sarampión por RCP-TR elaborados por los CDC en Atlanta (Estados Unidos) y por el Organismo de Protección Sanitaria en Londres (Reino Unido) son accesibles a quienes los soliciten a la OMS o a los laboratorios correspondientes.

Aunque no se recomienda en el diagnóstico rutinario de laboratorio, el cultivo de los virus del sarampión y de la rubéola a partir de muestras clínicas sí constituye un componente importante de las estrategias de control del sarampión y la rubéola. En el anexo 9.4.7 se presentan los procedimientos de aislamiento de virus de cultivos celulares.

5.1 Pruebas de IgM

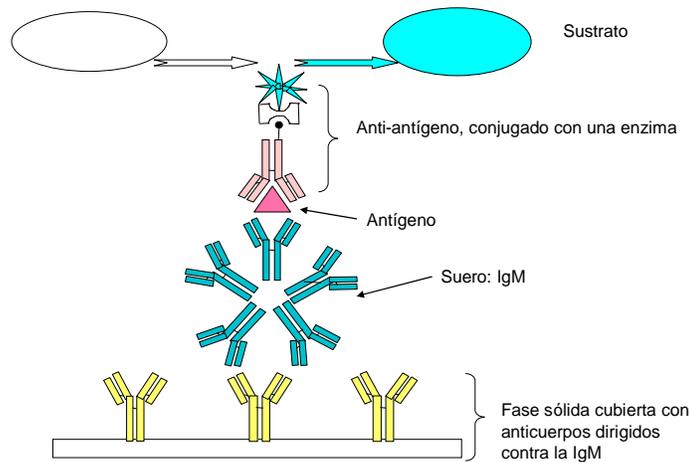
5.1.1 ELISA de captura de IgM

En el ensayo inmunoenzimático de captura de IgM (figura 15), el anticuerpo de tipo IgM en el suero del paciente se une al anticuerpo dirigido contra la IgM humana adsorbido sobre una fase sólida. Esta etapa no es específica del virus. Luego, se lava la placa a fin de extraer otras inmunoglobulinas y proteínas séricas. Enseguida se agrega el antígeno viral y se permite que se una a todas las IgM presentes, específicas del virus. Después de lavar, se detecta el antígeno fijado mediante un anticuerpo monoclonal dirigido contra el virus, conjugado a una enzima; a continuación, se revela la presencia o ausencia de IgM específica del virus en la muestra, gracias a un sistema de detección con sustrato cromógeno. Algunos métodos suministran la preparación lista

del complejo antígeno, anticuerpo monoclonal y enzima, con lo cual se elimina un ciclo de unión y lavado.

La prueba de captura de IgM del sarampión se puede adquirir en forma de kit de numerosas empresas, pero no se ha evaluado su uso la red de laboratorios de sarampión y rubéola. La OMS pone a la disposición de los interesados que lo soliciten, una descripción detallada de los procedimientos recomendados de la prueba.

Figura 15. Diagrama de la prueba ELISA de captura de IgM



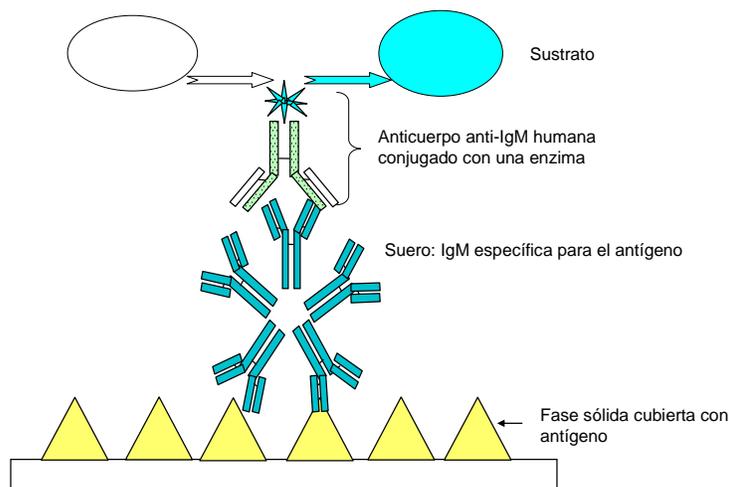
5.1.2 Ensayo inmunoenzimático indirecto de IgM específica del virus

En el ensayo inmunoenzimático indirecto de IgM (figura 16), se utiliza un absorbente del factor reumatoideo en una etapa previa al tratamiento, a fin de formar complejos con los anticuerpos IgG de los sueros que se han de analizar. El primer paso de absorción del antígeno viral sobre la fase sólida suele completarlo el fabricante y lo suministra listo para el uso. Se agrega luego el suero del paciente y entonces, todos los anticuerpos específicos contra el virus (IgM y todas las IgG no absorbidas) se unen al antígeno.

El anticuerpo de tipo IgM se detecta directamente por medio de un anticuerpo monoclonal dirigido contra la IgM humana, marcado con una enzima o indirectamente por medio de un anticuerpo monoclonal dirigido contra la IgM humana, más un anticuerpo antirratón marcado con una enzima. Se agrega un sustrato cromógeno con el fin de revelar la presencia de IgM específicas del virus en la muestra que se analiza.

Existen varios kits comerciales; en muchos laboratorios de la OMS se utilizan kits de detección de IgM específica del virus del sarampión y de IgM específica del virus de la rubéola producidos por Dade Behring, que han sido validados, junto con otros, usando una extensa serie de muestras de suero bien caracterizadas. [8, 48]

Figura 16. Diagrama de la prueba ELISA indirecta de IgM (Suero preabsorbido a fin de extraer la IgG y el factor reumatoideo)



La OMS pone a la disposición de los interesados que lo soliciten, una descripción detallada del procedimiento de la prueba, además de asesoramiento en la interpretación de los resultados.

El uso de los métodos alternativos de recolección de muestras como las gotas de sangre seca en papel filtro requiere una modificación de los procedimientos corrientes de las pruebas de IgM. El líquido eluido de las gotas de sangre seca se puede analizar mediante ensayos indirectos de IgM comercializados (como aquellos producidos por Dade Behring), modificando ligeramente los procedimientos [39]. Los detalles de esta modificación se presentan en el anexo 9.2. Siempre se debe verificar que el ensayo inmunoenzimático utilizado ha sido validado para el tipo de muestra que se examina.

5.1.3 Diagnóstico diferencial de laboratorio de sarampión y rubéola

Los laboratorios en las Regiones de la OMS con metas de eliminación del sarampión y de la rubéola analizarán sistemáticamente todas las muestras de los casos sospechosos para otras enfermedades. Los laboratorios en las Regiones que no tienen como meta la eliminación de la rubéola pueden analizar muestras para la rubéola, en función de las características epidemiológicas locales de la rubéola y de la situación de las actividades de control de la misma; la razón principal es que los casos sospechosos de sarampión son en ocasiones casos de rubéola. Los kits de ensayos de detección de IgM de rubéola son generalmente más costosos que los kits de sarampión y con frecuencia no es factible aplicar ambas pruebas a todas las muestras; una estrategia eficaz de utilización de los recursos consiste en detectar primero la IgM del sarampión en todas las muestras y buscar la IgM de la rubéola solo en las muestras negativas para el sarampión (figura 17). Los laboratorios de los países con un programa de inmunización antisarampionosa eficaz y en consecuencia una incidencia de sarampión muy baja, pero con una vacunación antirrubéolica muy baja o sin ella, pueden hacer el mejor uso de sus recursos, analizando las muestras de los casos de enfermedad exantemática febril (o de casos sospechosos de sarampión o rubéola) primero con una prueba de IgM de rubéola y cuando este resultado sea negativo buscar luego la IgM del sarampión (figura 18).

Figura 17. Muestra única de sangre tomada hasta el día 28 en Regiones SIN metas de eliminación de la rubéola

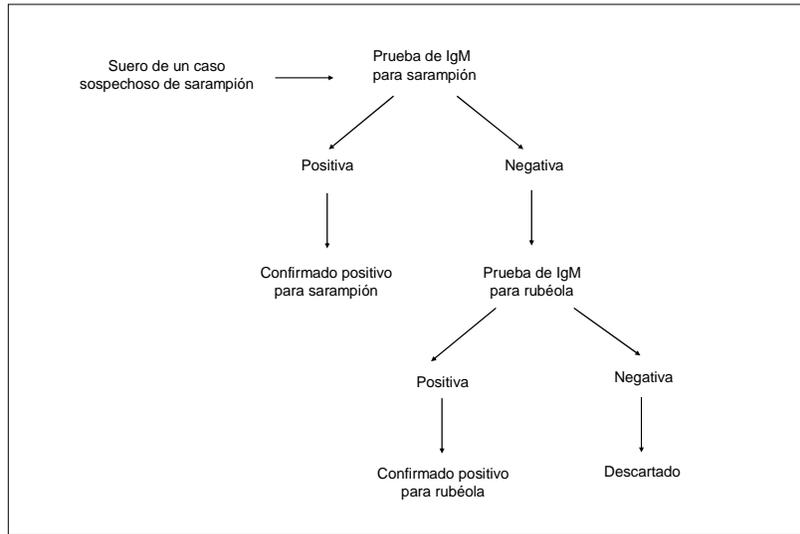
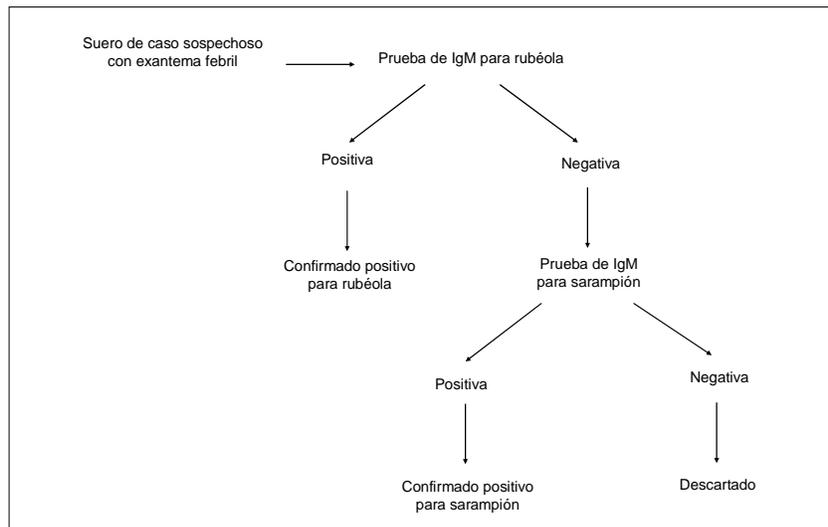


Figura 18. En países con incidencia muy baja de sarampión y vacunación antirrubéolica baja o ausencia de ella en Regiones SIN metas de eliminación de la rubéola



5.1.4 Interpretación de los resultados de la prueba de IgM en pacientes con antecedente de vacunación reciente

Dado que la vacunación con la vacuna combinada contra la rubéola y el sarampión y con la triple viral estimula las respuestas específicas de IgM contra el sarampión y contra la rubéola, el antecedente de vacunación con una de las dos *hasta seis semanas antes del comienzo del exantema* dificulta la interpretación de los resultados de las pruebas serológicas. En un estudio randomizado de doble ciego de 581 pares de gemelos, de 460 niños entre 14 y 18 meses de edad, 32% presentaron fiebre moderada o alta después de la vacuna triple viral (comparados con 9% de quienes recibieron placebo; $p < 0,002$), con una incidencia máxima entre 9 y 10 días después de la inyección. Entre el noveno y el décimo días también fueron más frecuentes en los niños vacunados

que en aquellos que recibieron placebo, signos como irritabilidad (7,3% contra 4,0% en quienes recibieron placebo), somnolencia (3,5% contra 1,4%) y exantema (4,3% contra 3,0%), [44]. Las pruebas serológicas no permiten establecer la diferencia entre la respuesta inmunitaria a la infección natural y a la vacunación; esto sólo se puede conseguir con el aislamiento viral y su caracterización. Además, estudios realizados en Europa revelaron que los parvovirus B19, los enterovirus, los adenovirus, el herpes virus humano de tipo 6 y los estreptococos de grupos A y C son los patógenos que causan con mayor frecuencia las enfermedades exantemáticas febriles y representan de un tercio a la mitad de todos los casos [45, 46]. En ambientes tropicales, cerca de un tercio de infecciones primarias por el virus del dengue puede comportar erupciones cutáneas y fiebre [47] y este virus es la causa de la gran mayoría de casos de exantema y fiebre observados en períodos epidémicos de dengue. En estas circunstancias, es posible que entre los casos de exantema febril causados por otros patógenos se encuentren personas que han recibido recientemente la vacuna combinada contra la rubéola y el sarampión o la triple viral y que una respuesta de IgM provocada por la vacuna se atribuya erróneamente a una infección por el virus del sarampión o de la rubéola. Por consiguiente, se recomienda que en los casos con IgM positiva y antecedente de vacunación antisarampionosa, antirubeólica o ambas entre 1 y 6 semanas antes de la aparición del exantema, el diagnóstico de infección se elimine después de una investigación epidemiológica minuciosa, que no ponga en evidencia pruebas de otros casos confirmados en los alrededores ni de un vínculo epidemiológico con casos confirmados. Los países en la fase de eliminación deben considerar la posibilidad de realizar (según convenga) las pruebas de dengue, parvovirus B19 y herpes virus humano de tipo 6 como parte del diagnóstico diferencial de todos los casos con resultados positivos de IgM de sarampión y rubéola.

5.1.5 Interpretación de los resultados de muestras con pruebas de IgM positivas simultáneamente para sarampión y rubéola

Varios laboratorios de la red participarán en programas nacionales e internacionales de vigilancia y diagnóstico de otras enfermedades infecciosas además del sarampión y la rubéola y contarán con los medios de realizar pruebas de IgM específicas de una gama de virus cuya infección comporta exantema y fiebre. Si bien las pruebas comerciales de detección de IgM del sarampión y la rubéola suelen ofrecer una especificidad igual o superior al 95%, ocasionalmente los sueros analizados parecieran dar resultados positivos de IgM a numerosos patógenos, entre los cuales los virus del sarampión, la rubéola, el Epstein-Barr, el citomegalovirus y el parvovirus humano B19 [4, 21, 48]. Entre las causas más frecuentes de reacciones falsas positivas se cuentan la presencia en las muestras de factor reumatoideo, IgG específicas e IgM inespecíficas que generan reacciones cruzadas. Las concentraciones de IgM específicas en respuesta a la infección y a la vacunación con el virus del sarampión y la rubéola, suelen disminuir por debajo del umbral de detección en 1 a 2 meses [49]. Además, en pacientes infectados por otros virus, en particular el Epstein-Barr pueden ocurrir respuestas de anticuerpos IgM heterotípicos y los sueros de estos pacientes pueden dar resultados falsos positivos de IgM de sarampión, de rubéola o de ambos [50]. Estos factores hacen muy difícil la interpretación de la detección de IgM específicas de sarampión y rubéola cuando no existen síntomas clínicos claros, sobre todo en países con baja incidencia. En estos casos, pueden ser útiles en la interpretación las pruebas confirmatorias, como la RCP-TR, el aislamiento positivo del virus, el aumento al cuádruple de los títulos de IgM en muestras séricas de fase aguda y de convalecencia o la prueba de avididad de la IgG.

5.2 Pruebas de anticuerpos de tipo IgG

El uso de la detección de IgG a fin de confirmar una infección reciente requiere el análisis en paralelo de dos muestras de suero obtenidas con un intervalo mínimo de 10 días. Dado que a menudo puede ser difícil obtener la segunda muestra, se recomiendan las pruebas de IgM con muestra única. Sin embargo, cuando los resultados del análisis no son concluyentes, se puede

recoger otra muestra sérica (fase de convalecencia) entre 10 y 30 días después de la primera muestra (fase aguda), con el objeto de determinar un aumento del título de IgG. Sin embargo, la primera muestra sérica se debe obtener en los 10 primeros días de iniciado el exantema y la prueba de IgG para confirmación por laboratorio requiere la demostración de un aumento al cuádruple del título del anticuerpo contra el sarampión o la rubéola. Las pruebas diagnósticas de IgG se deben realizar en forma simultánea con muestras de período agudo y de período de convalecencia, aplicando el mismo tipo de prueba. Los criterios específicos que confirman un aumento del valor dependen de cada prueba. Los valores de densidad óptica de los ensayos inmunoenzimáticos no corresponden a los títulos y su incremento no equivale directamente al aumento de los mismos.

Los ensayos más ampliamente utilizados en la detección de anticuerpos IgG contra el sarampión y la rubéola son los ensayos indirectos. En estos análisis, el antígeno viral purificado se adsorbe sobre una fase sólida y luego se agrega el suero del paciente. Todo anticuerpo específico del virus se une al antígeno y las IgG específicas del virus se ponen en evidencia gracias a una IgG antihumana. La unión de la IgG específica del virus se mide mediante un sistema de detección directa o indirecta por intermedio de un sustrato cromógeno.

5.2.1 Prueba de avidéz de la IgG

La avidéz de un anticuerpo se refiere a la fuerza de la interacción del anticuerpo con un antígeno polivalente. Según la fuerza de esta unión, el complejo formado se disocia con mayor o menor facilidad. La avidéz del anticuerpo es baja después del contacto primario con el antígeno, se fortalece con el tiempo y en general hace intervenir anticuerpos de tipo IgG [51, 52]. Los ensayos que miden la avidéz de la unión del antígeno a los anticuerpos IgG se han concebido con el fin de diferenciar los anticuerpos de baja afinidad, producidos durante la fase inicial de la infección, de aquellos con una unión de alta afinidad que reflejan una inmunidad pasada. Las pruebas de avidéz de IgG pueden ayudar a diferenciar las infecciones primarias y secundarias por el virus de la rubéola y a excluir la posibilidad de IgM residual, meses o años después de la infección primaria. Sin embargo, los análisis de avidéz de IgG son difíciles de implementar, de estandarizar y de interpretar, es difícil su control de calidad y se recomiendan sólo en los laboratorios con experiencia en este tipo de ensayos. La OMS pone a la disposición de los interesados que lo soliciten la lista de laboratorios con pericia en la realización de análisis de avidéz de IgG para confirmación de la infección por el virus de la rubéola.

5.3 Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa

La función más importante de la RCP-TR en el control del sarampión y la rubéola reside en la caracterización genética de los virus salvajes causantes y la detección de variación genómica en diferentes momentos y regiones del mundo. Dado que la RCP-TR puede detectar partículas virales inactivadas, el lapso de detección del virus, después de la aparición del exantema, suele ser varios días más prolongado que el lapso del aislamiento viral. Sin embargo, la RCP-TR presenta algunos problemas técnicos relacionados con la sensibilidad y reproducibilidad que pueden invalidar el análisis. Además, la contaminación cruzada durante la RCP-TR constituye un problema importante, a menos que se establezcan y se mantengan las más estrictas normas de laboratorio. Por estas razones no se recomienda que los laboratorios realicen pruebas de RCP, a menos que cuenten con espacios especiales designados para cada uno de los procedimientos de la prueba y con personal que haya recibido una capacitación exhaustiva.

La OMS pone a la disposición de los interesados que lo soliciten, los protocolos de confirmación de laboratorio de la infección por los virus del sarampión y de la rubéola mediante RCP-TR.

5.4 Aislamiento del virus en cultivo celular

Aunque rara vez útil en el diagnóstico del sarampión, el cultivo del virus sí constituye un elemento de gran importancia en la vigilancia epidemiológica molecular de los virus del sarampión y de la rubéola.

5.4.1 Sarampión

La existencia de líneas celulares susceptibles, que permitan el aislamiento viral del sarampión de las muestras clínicas y la aplicación sistemática de técnicas de RCP-TR y de secuenciación ha hecho posible la rápida caracterización genética de un gran número de cepas salvajes de virus del sarampión. Esta base de datos sobre la secuencia permite usar técnicas de epidemiología molecular a fin de descubrir la fuente de virus salvajes y diferenciar entre las cepas salvajes y las cepas vacunales.

Inicialmente, la línea celular preferida en el aislamiento primario del virus del sarampión fue la B95a, una línea linfoblastoide de tipo B de tití, transformada por el virus de Epstein-Barr. Estas células ofrecen una sensibilidad hasta 10.000 veces más alta en el aislamiento viral del sarampión de muestras clínicas, que las demás líneas celulares usadas habitualmente. El mantenimiento de las células B95a en el laboratorio es relativamente sencillo y el efecto citopático de la infección del sarampión se observa sin dificultad. Sin embargo, esta línea celular está infectada por el virus Epstein-Barr, lo cual representa un riesgo para los técnicos de laboratorio. Estas células se deben manipular en todo momento como material infeccioso. Por este motivo, la B95a ya no es la línea celular de elección en el aislamiento de los virus del sarampión por los laboratorios de la red.

Recientemente, se ha evaluado la línea Vero/SLAM, con el objeto de utilizarla en la Red Mundial de Laboratorios. Estas son células Vero, en las cuales se ha introducido por transfección un plásmido que codifica el gen humano de la molécula activadora de la señalización del linfocito, (SLAM, por sus siglas del inglés: *signalling lymphocyte-activation molecule*; también conocida como CDw150); esta glicoproteína de la membrana descubierta recientemente, se expresa en algunas células T y B y es un receptor celular del virus del sarampión [53]. El aislamiento viral del sarampión en las células Vero/SLAM ofrece una sensibilidad equivalente a la de las células B95a. Además, las células Vero/SLAM son susceptibles a las cepas del sarampión adaptadas en laboratorio, incluidas las cepas vacunales [54]. También se ha notificado que las células Vero/SLAM son sumamente susceptibles a los virus de la rubéola, pero el efecto citopático producido por este virus puede ser difícil de detectar. La ventaja de las células Vero/SLAM es que no están infectadas por un virus en forma continua, y por consiguiente, representan un riesgo biológico menor que las células B95a. La desventaja de las células Vero/SLAM reside en que requieren un medio de cultivo que contenga geneticina, a fin de retener la expresión de SLAM. Sin embargo, una vez que se prepara el “stock” de células en presencia de geneticina, la expresión de SLAM se conserva como mínimo durante los 15 pases posteriores sin geneticina, lo cual permite ahorrar el costo suplementario del medio de cultivo celular con geneticina.

El Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de Tokio, Japón suministró a la Red de Laboratorios cultivos patrones de células Vero/SLAM, establecidas por el Dr. Yanagi y sus colegas en Kyushu University, Fukuoka, Japón [55] y ahora se pueden conseguir en los repositorios regionales de células. Las células Vero/SLAM se pueden obtener mediante solicitud por conducto de la OMS.

En el [anexo 9.3.7](#) se presenta un protocolo de aislamiento de los virus del sarampión y de la rubéola usando células Vero/SLAM.

5.4.2 Rubéola

El virus de la rubéola se puede aislar de las muestras nasofaríngeas, sanguíneas, de garganta, de orina y de líquido cefalorraquídeo recogidas en forma adecuada de los casos de rubéola y de SRC. El virus de la rubéola crecerá en las células Vero/SLAM y el uso de estas células se recomienda actualmente en la Red Mundial de Laboratorios. Las células Vero también se pueden usar en el aislamiento viral de la rubéola.

En los CDC de Atlanta se ha elaborado un método de detección de la glicoproteína E1 del virus de la rubéola en células Vero infectadas, usando anticuerpos monoclonales mediante pruebas de inmunofluorescencia o inmunocolorimétricas. Con estos métodos se detecta el antígeno viral en cultivos monoestrato de células Vero/SLAM o de células Vero, que han sido infectadas e incubadas a 35°C durante 3 o 5 días. En el anexo 9. 4.15 se suministran los detalles del procedimiento.

6. Manejo de los datos y notificación

Una parte esencial del trabajo de cada laboratorio consiste en registrar los datos de todas las muestras analizadas y de los resultados de las pruebas y comunicar dichos resultados. Un buen laboratorio analizará además los resultados que obtiene, interpretará sus resultados, buscará modelos epidemiológicos o tendencias y resumirá los resultados en forma de informes periódicos. El término “manejo de los datos” engloba todas estas actividades y representa una función primordial de todo sistema de vigilancia de enfermedades. **Las oficinas regionales de la OMS facilitarán detalles sobre los requisitos en materia de notificación de datos en función del nivel y las actividades de los laboratorios de sarampión y rubéola de la OMS, dentro de cada red regional de laboratorios.**

6.1 Objetivos de el manejo de los datos

Un buen manejo de datos comienza comprendiendo:

- el significado de la información generada;
- lo que se debe comunicar a las personas por fuera del laboratorio;
- a quién se debe comunicar; y
- con qué frecuencia.

Cada laboratorio debe:

- comunicar los resultados en un formato organizado al Programa Ampliado de Inmunización y como respuesta a la persona que remitió las muestras;
- producir informes de su trabajo al director o jefe del instituto en forma de informes anuales o informes sobre los progresos realizados; y
- elaborar informes recapitulativos que justifiquen la prolongación de su financiamiento.

Una vez definidos todos estos requisitos, se puede determinar el tipo de información que se debe registrar, con el fin de simplificar su cumplimiento. Como regla general, cuanta más información se deba recopilar y registrar, mayor es la posibilidad de obtener una información deficiente, con más omisiones y errores. Siempre es más factible recoger y registrar con exactitud una menor cantidad de información; pero en el caso de recoger menos información, es primordial que esta sea la información **necesaria**.

El paso siguiente en el manejo de los datos consiste en decidir la forma concreta como habrá de registrarse y almacenarse la información. Todos los laboratorios llevan libros de registro de las muestras y de los resultados de laboratorio. Con frecuencia se trata de registros en papel, consignados línea por la línea, entrando la información en columnas específicas. Tales registros se denominan registros por líneas, ya que toda la información relativa a una muestra o a un caso se encuentra leyendo a lo largo de una línea de información.

En los laboratorios con un bajo volumen de trabajo, los registros en papel satisfacen todos los requisitos en materia de notificación. En laboratorios con mayores volúmenes de trabajo suele ser más conveniente establecer un sistema informático de registro. De conformidad con los requisitos de la red regional, en algunos laboratorios puede ser suficiente un sistema sencillo en hojas de cálculo (usando programas informáticos como Excel), que corresponda al registro por líneas de los registros en papel. Si bien las hojas de cálculo informáticas son útiles en algunos tipos de análisis, su manipulación no es sencilla cuando trata de grandes cantidades de información. En este caso, es mejor establecer una base de datos computarizada.

La elección del método exacto de informatización del registro de laboratorio depende de una serie de factores, entre ellos:

- la preferencia de los usuarios;
- la capacidad y accesibilidad de equipos informáticos;
- la accesibilidad y costos de los programas informáticos;
- el tipo de programación requerida a fin de utilizar el soporte lógico;
- la pericia local en la elaboración y mantenimiento del sistema.

Como condición mínima, el sistema elegido debe permitir el acceso rápido y preciso a los registros seleccionados, a fin de realizar cálculos sencillos, como frecuencias e intervalos y de crear cuadros y gráficos. A menudo es una ventaja establecer un “sistema de menú” que ayude a los usuarios no experimentados a ejecutar de manera más eficiente acciones repetitivas, como la entrada de datos. El sistema debe contener información útil a los usuarios y a los programadores. Esta documentación incluye descripciones claras de los procedimientos de instalación, operación, estructura, adaptación a necesidades específicas, actividades de mantenimiento necesarias, requisitos del manejo de los archivos y codificación de listas cuando se utiliza información codificada.

Todo sistema computarizado de registro de laboratorio debe contar con los siguientes componentes:

- entrada de datos;
- corrección de datos (programas que detecten errores en la información entrada);
- copias de seguridad sistemáticas de los datos (*backup*);
- análisis y notificación sistemáticos (destinados a la toma de decisiones, la acción y la supervisión);
- retroalimentación (información que se debe enviar a los investigadores de los casos);
- reporte o transmisión de datos (información que se debe comunicar al nivel superior).

Al diseñar todo sistema de registro de resultados de laboratorio, es esencial involucrar a alguien que comprenda los objetivos y estrategias del control de enfermedades, los requerimientos de la vigilancia y los indicadores de desempeño de la actividad. Esta persona será normalmente alguien de un nivel más central. El componente de reporte, en particular, no se puede diseñar a menos que el nivel superior haya especificado claramente sus necesidades de información de manera que el formato y la estructura de los informes se pueda adecuar a sus necesidades.

Todas las partes involucradas en el sistema se deben poner de acuerdo claramente sobre el tipo de información que se notifica, el sitio de donde se envía y a donde llega la información. Es evidente que los informes de retroalimentación y de reporte tendrán diferentes formatos y diferentes frecuencias. Lo ideal es que todo el flujo de información sea jerárquico y se dirija al nivel superior, sin omitir niveles. La información también se puede “difundir” (enviarla a varias fuentes, a diferentes niveles al mismo tiempo). Una vez que se ha establecido un modelo de flujo de

información es muy importante cumplirlo sin excepción. Asimismo, es importante evaluar esporádicamente el sistema, con el fin de verificar que está cumpliendo con la función para la cual se diseñó y decidir si se pueden introducir mejoras. En caso de introducir modificaciones al sistema, es esencial comunicarlas a todas las partes involucradas y que estas las acepten.

La llevada de los registros de laboratorio y el mantenimiento de su exactitud y pertinencia implican buenas prácticas de manejo y una clara designación de responsabilidades. El éxito o fracaso de toda iniciativa de salud pública o de control de enfermedades depende de la instauración y mantenimiento de un buen sistema de intercambio de información, que proporcione datos exactos y oportunos con miras a una acción apropiada. Nunca es demasiado cuando se insiste sobre la importancia de un buen manejo de los datos de laboratorio.

Desde luego, cualquiera que sea el sistema de manejo, los datos brutos del análisis de las muestras se deben consignar en un formato de fácil acceso. Además de los resultados de las muestras, la tabulación de la información sobre las pruebas debe incluir el kit de análisis utilizado, las características del kit (por ejemplo, número del lote, fecha de caducidad), valores de absorbencia de las muestras del paciente y de la muestra de referencia, cálculo y resultados de las muestras de control de la calidad, el nombre del operador de la prueba y de la persona que verificó los resultados antes de notificarlos.

6.2 Registro del recibo de la muestra

Cada caso sospechoso de sarampión investigado debe contar con un formulario de investigación diligenciado. En el momento de la obtención de la muestra se debe llenar un formulario específico de solicitud de laboratorio, el cual acompañará a todas las muestras que se remitan. La información sobre las etiquetas de la muestra se debe verificar cuidadosamente de manera que coincida con la información sobre los formularios de solicitud. El formulario de solicitud de laboratorio que acompaña a cada muestra debe contener la siguiente información (véase modelo en el [anexo 9.1](#)):

- el número único de identificación del caso (en un formato acordado);
- el diagnóstico presuntivo;
- el número interno de laboratorio (optativo, pero a menudo importante);
- el nombre del paciente (en escritura española);
- edad (o fecha de nacimiento en notación ordinaria);
- la provincia (departamento, estado o región);
- el pueblo o distrito o municipio;
- el código del país (asignado por Oficina Regional de la OMS);
- la fecha y el tipo de la última vacunación (por ejemplo, sarampión, combinada: sarampión y rubéola o triple viral: sarampión, rubéola y parotiditis);
- la fecha de aparición del exantema;
- ¿corresponde el paciente a la definición de caso?;
- el tipo de la muestra;
- la fecha de recogida de la muestra; y
- la fecha del envío de la muestra al laboratorio.

Al recibir una muestra, el laboratorio debe registrar la siguiente información adicional:

- la fecha de recibo de la muestra en el laboratorio;
- la suficiencia de la muestra (volumen);

- el estado de la muestra al recibirla (destinado al responsable del programa ampliado de inmunización como retroalimentación); y
- las medidas preparatorias realizadas (elución, separación, centrifugación, ubicación del almacenamiento, etc.).

A cada muestra se debe asignar un número específico de identificación que se consigna en el “libro del día” del laboratorio, en la solicitud que acompaña a la solicitud y en el envase de la muestra. Este número puede ser una versión abreviada del número de identificación del caso o un número consecutivo único del laboratorio. Este número se debe usar en todos los recipientes, tubos de centrifuga, tubos de ensayo y viales utilizados en cada uno de los procedimientos posteriores del laboratorio.

6.3 Registro de los resultados

La información que se debe consignar y registrar sobre el procesamiento de las muestras y los resultados comprende, como mínimo los siguientes datos:

- el número de identificación del caso;
- la fecha del análisis;
- el tipo de prueba (IgM, RCP-TR, cultivo de virus);
- las lecturas de densidad óptica;
- el resultado de la prueba;
- la fecha de notificación del resultado al responsable del programa ampliado de inmunización; y
- si se envió una muestra al laboratorio regional de referencia (sí o no)

En caso afirmativo:

- el nombre del laboratorio regional de referencia;
- la identificación de laboratorio de la muestra enviada (número de la muestra en el laboratorio local);
- la fecha del envío de la muestra al laboratorio regional de referencia;
- la fecha de recepción del resultado del laboratorio regional de referencia;
- el resultado del laboratorio regional de referencia; y
- la fecha de notificación del resultado al responsable del programa ampliado de inmunización.

6.4 Notificación de la actividad del laboratorio y los resultados

Los resultados de laboratorio se deben notificar de una manera oportuna y exacta por varias razones. La notificación de los resultados de laboratorio tiene una consecuencia directa sobre el programa de control y de eliminación del sarampión por conducto de:

- la retroalimentación a los equipos del programa ampliado de inmunización nacional con fines de seguimiento de los casos y planificación de las actividades suplementarias de vacunación;

- la coordinación del programa de control y eliminación por parte de la OMS y de otros organismos y entidades internacionales; y
- la supervisión de los resultados y el desempeño de los laboratorios con el fin de detectar posibles problemas y limitaciones.

La notificación periódica de los resultados ofrecerá un registro continuo, como prueba de la aplicación de procedimientos recomendados y aprobados y del mantenimiento de una precisión aceptable en el desempeño del laboratorio.

6.4.1 Retroalimentación a los equipos del programa ampliado de inmunización

Los detalles sobre la forma y la periodicidad de los informes del laboratorio a los responsables del programa ampliado de inmunización se deben definir localmente. En general, todos los resultados se han de notificar en la semana que sigue a la recepción de la muestra de suero y los casos positivos (cuando no ha habido casos recientes) se deben notificar en un plazo de 24 horas. Todos los demás resultados deben estar a la disposición de los responsables del programa ampliado de inmunización, cuando estos los soliciten. También es útil al programa realizar mensualmente una notificación formal de los resultados de laboratorio al responsable del programa ampliado de inmunización.

Los responsables del programa ampliado de inmunización deben recibir cuanto antes la información referente a las muestras insatisfactorias, el transporte inadecuado de las mismas y los elementos de datos que faltan, con el objeto de informar al personal en el campo e introducir las mejoras necesarias.

6.4.2 Informes mensuales a la OMS

Se solicita a todos los laboratorios nacionales que suministren un informe mensual de los resultados a la OMS. Esta información se usa en la actualización de los resúmenes del país, la supervisión del desempeño del laboratorio y la coordinación de la actividad del organismo internacional. Los datos suministrados en los informes mensuales son esenciales en la coordinación integral del programa; la remisión de informes mensuales oportunos y exactos debe constituir una actividad prioritaria de todos los laboratorios en la red.

Dada la cantidad de datos tratados y el tiempo que precisa el análisis de la información, es esencial que los laboratorios que manejan más de 100 muestras por año entreguen sus informes mensuales en un formato de base de datos computarizado, en disquetes o que los envíen por correo electrónico. En la actualidad, la OMS puede proveer un conjunto de programas de manejo de datos de laboratorio, adecuado a la mayoría de los laboratorios de la red mundial de sarampión.

7. Transporte seguro de las muestras y de los aislados clínicos

Este capítulo se refiere principalmente al transporte internacional de material infeccioso y potencialmente contagioso, de un laboratorio a otro dentro de la red mundial de laboratorios.

El envío seguro de las muestras de diagnóstico y del material infeccioso representa una preocupación de todas las personas que participan en el sistema. Existen diversos reglamentos nacionales e internacionales que contemplan los procedimientos y requisitos del transporte de muestras de diagnóstico y materiales derivados de las mismas. El incumplimiento de estos reglamentos puede dar lugar a retrasos innecesarios, pérdida de viabilidad de las muestras o a un aumento del riesgo de exposición accidental del personal de transporte, el remitente, el destinatario o del público a materiales potencialmente infecciosos. El porte manual de sustancias infecciosas, como sería el uso de las valijas diplomáticas con esa finalidad, está estrictamente prohibido por las empresas de transporte internacional. El envío exitoso de los materiales dentro de la red mundial de laboratorios requiere planificación, embalaje, rotulación y documentación adecuados y comunicación entre todas las partes interesadas (remitente, transportador y destinatario).

7.1 Planificación

El laboratorio remitente tiene la responsabilidad de procurar una correcta designación, embalaje, rotulado y documentación de todos los materiales expedidos por el laboratorio. El transporte eficaz de los materiales infecciosos precisa una buena coordinación entre el remitente, el transportador y el destinatario (laboratorio receptor), de manera que el transporte sea seguro y el material expedido llegue a tiempo y en buen estado. Tal coordinación depende de una comunicación bien establecida y de una relación de socios entre las tres partes.

Una vez que se ha definido la necesidad de enviar materiales del laboratorio, se debe contactar al destinatario e informarlo sobre la naturaleza del material que se envía. El remitente se debe informar acerca de la exigencia de cualquier licencia de importación por parte del gobierno nacional del laboratorio receptor. Cuando se precisan licencias, el laboratorio destinatario tendrá que obtener la licencia VIGENTE y enviarla al laboratorio que remite (generalmente una copia enviada por fax), de manera que este pueda entregarla al transportador. El laboratorio de origen debe solicitar información al destinatario con respecto a los transportadores recomendados. El remitente y el destinatario deben tomar con antelación las medidas necesarias a fin de definir el momento más oportuno del envío, de manera que se cuente con el personal adecuado a la recepción del envío. Se recomienda evitar las entregas durante el fin de semana.

Cuando el laboratorio receptor está al corriente de la necesidad de un envío, el laboratorio de origen debe entrar en contacto con un transportador con experiencia en la manipulación de sustancias infecciosas y de muestras de diagnóstico y tomar las disposiciones que garanticen:

- que se aceptará la remesa;
- que la remesa se encaminará por la ruta más directa, evitando la entrega durante el fin de semana y días feriados;
- que se conservará documentación sobre el progreso del envío;
- que se supervisarán las condiciones de la remesa durante el tránsito; y
- que se notificará todo retraso al remitente.

El remitente se debe informar acerca de todos los documentos de envío que puede precisar el transportador y de todas las condiciones específicas que aseguren una entrega segura de la remesa. El transportador también puede prestar asesoramiento sobre el embalaje.

7.2 Embalaje

El embalaje y la rotulación adecuados del material que ha de enviarse son de vital importancia a fin de conservar la integridad de las muestras, evitar accidentes y procurar que no haya ningún retraso por causa de violación de los reglamentos. Los requisitos de embalaje de diversos tipos de materiales de laboratorio dependen de reglamentos nacionales e internacionales. Existen diversos organismos mundiales autorizados que imparten capacitación al personal sobre la forma de empacar los materiales en cumplimiento de las normas internacionales.

Los reglamentos internacionales del transporte de materiales infecciosos por cualquier medio de transporte se basan en las recomendaciones del Comité de Expertos en Transporte de Mercaderías Peligrosas de las Naciones Unidas. Las organizaciones internacionales como la Unión Postal Universal (UPU), la Organización de Aviación Civil Internacional (OACI) y la IATA han incorporado estas recomendaciones en sus reglamentos respectivos. La OMS desempeña una función asesora frente a estos organismos.

Los embalajes que no se ajustan a la reglamentación tienen mayor probabilidad de sufrir deterioro o fugas durante el transporte. En la reunión de expertos de la OMS en 2001 se acordó que serían suficientes embalajes con dos niveles de protección a fin de contener los riesgos que supone toda la gama de patógenos conocidos. Con base en la evaluación del riesgo, las sustancias infecciosas que contienen patógenos que requieren precauciones particulares justifican su inclusión en la categoría A. Estas sustancias se deben enviar en embalajes de tipo **IP 620**. Los materiales de la categoría B (incluidos el virus del sarampión y la rubéola) suponen menos riesgos, pues no se transmiten con facilidad y las precauciones y prácticas higiénicas básicas previenen la exposición y la infección en caso de que se produzca un incidente. Las sustancias de la categoría B se deben enviar en embalajes de tipo **IP 650**. La justificación de los requisitos de embalaje basada en la evaluación del riesgo se describe en el documento de la OMS: *Transporte de sustancias infecciosas. Información general sobre las enmiendas a la 13.^a revisión de la reglamentación modelo de las Naciones Unidas en lo relativo al transporte de sustancias infecciosas* (WHO/CDS/CSR/LYO/2004.9 - http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/en/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_9Final.pdf).

Las muestras clínicas (con fines diagnósticos, incluidos suero, hisopos de garganta y orina), se deben enviar como mínimo en embalajes de tipo **IP 650**. Sin embargo, los cultivos de virus infecciosos, aún de organismos infecciosos que pertenecen a la categoría B, se deben enviar en embalajes de tipo **IP 620**. La razón es que los cultivos contienen en general mayor cantidad de microorganismos en un volumen determinado, comparados con las muestras clínicas, y tienen por consiguiente mayor probabilidad de liberar una dosis infectante como consecuencia de un incidente de exposición. En el [anexo 9.5](#) se suministran las instrucciones vigentes de los embalajes de tipo **IP 650** e **IP 620**. A partir de 2005, las muestras de sangre seca *no están sometidas a la Reglamentación de Mercaderías Peligrosas de la IATA*. (referencia IATA)

7.3 Preparación y envío

La documentación necesaria con fines de envío de sustancias está determinada por la naturaleza de los materiales expedidos. En general, cada remesa debe contener los siguientes documentos:

- el listado de embalaje, factura pro forma, declaración de aduana o factura comercial que indique la dirección del destinatario, el número de paquetes, el detalle del contenido, el peso y el valor (necesario sólo en el envío internacional);
- la guía aérea cuando se expide por vía aérea;
- la documentación de exportación e importación, cuando sea necesaria;
- la guía aérea que contenga:
 - el nombre, la dirección y el número de teléfono y fax del destinatario;
 - el número de muestras;
 - “altamente perecedero”;
 - “contactar con el destinatario por teléfono a la llegada” (repetir el número de teléfono);
 - información sobre la manipulación;
 - “URGENTE: NO RETRASAR: Muestras biológicas altamente perecederas, almacenar entre 4°C y 8°C”

Una vez que se ha enviado el paquete, se debe notificar de inmediato al destinatario:

- el número de muestras;
- el número estimado de cajas y su peso;
- el vuelo, la fecha y hora de llegada;
- el número de la guía aérea.

Además, se debe informar al destinatario que se ha enviado una copia de la guía aérea al laboratorio receptor y se le solicita que informe al remitente en caso de no recibir el paquete.

Una vez que se ha recibido el paquete, el destinatario debe acusar de inmediato su recibo al remitente, la condición del material y todo problema encontrado. Esta etapa se facilita cuando el remitente incluye un formulario de respuesta por fax en la remesa, que el destinatario utilizará con esta finalidad.

8. Garantía de la calidad de los laboratorios de la red

La garantía de la calidad del laboratorio atañe a los procedimientos organizativos y las condiciones de planificación, realización, supervisión, registro y notificación de las actividades de laboratorio. El cumplimiento de los principios de garantía de la calidad por parte de los laboratorios facilita una planificación adecuada de las actividades y la provisión de los medios suficientes a fin de llevarlas a cabo. Favorece una notificación completa y exacta y proporciona un medio de verificación de la integridad de las actividades.

8.1 Establecimiento de sistemas de control de calidad

Establecer un sistema de control de la calidad en un laboratorio significa definir la estructura orgánica, las responsabilidades, los procedimientos, métodos y recursos necesarios con el fin de alcanzar los siguientes objetivos:

- prevenir los riesgos;
- detectar las desviaciones de los protocolos establecidos;
- corregir los errores;
- mejorar la eficiencia;
- velar por la calidad e integridad de los datos.

El director o jefe del laboratorio está encargado de establecer, ejecutar y procurar el cumplimiento del control de la calidad. Sin embargo, todo el personal del laboratorio toma parte en este mecanismo. El control de la calidad comprende varios elementos que se especifican a continuación.

8.1.1 Personal

El laboratorio de sarampión y rubéola debe contar con personal suficiente, que tenga la formación y experiencia adecuadas a fin de realizar en forma segura y precisa todas las funciones y responsabilidades requeridas en este tipo de laboratorio. El laboratorio debe preparar un organigrama del laboratorio de sarampión y rubéola que traduzca la jerarquía y las líneas de autoridad e incluya las funciones y responsabilidades de cada persona.

La plantilla de personal debe contar con:

- un director o jefe de laboratorio;
- un jefe de cada sección o unidad según corresponda, por ejemplo, laboratorios de pruebas serológicas, cultivo celular o biología molecular, etc.;
- personal científico, técnico y auxiliar;
- personal de apoyo administrativo, mantenimiento, limpieza y servicios;

Cada puesto debe tener una descripción del trabajo, que comprenda: las funciones y responsabilidades, la capacitación académica y la experiencia necesarias.

8.1.2 Dotación de personal

La plantilla de un laboratorio debe ser suficiente, a fin de permitir la realización de todas las funciones previstas en un laboratorio de sarampión y rubéola, sin afectar a la seguridad ni a la integridad de los procedimientos realizados en el laboratorio. Dentro del laboratorio, existen actividades especializadas que requieren un personal con experiencia considerable, como las pruebas inmunoenzimáticas, la producción de cultivos celulares, la lectura del efecto citopático en los cultivos de virus, los procedimientos de detección viral, las técnicas de RCP-TR y la secuenciación.

Se debe contar como mínimo con una persona que tenga por lo menos 12 meses de experiencia pertinente a la realización de estas actividades. Es aconsejable que por lo menos otra persona colabore con la persona experimentada, a fin de que adquiriera comprensión de la actividad, se cree capacidad dentro del laboratorio y se establezca una reserva en caso de ausencia de personal.

8.1.3 Recursos humanos

El objetivo fundamental de la política de recursos humanos es contar con personal fiable, cuya capacitación científica y técnica le permita aplicar correctamente los procedimientos de laboratorio apropiados y remunerarlo según las condiciones del mercado del trabajo. El laboratorio debe organizar y coordinar en forma periódica cursos de capacitación con el objeto de extender y actualizar las aptitudes del personal técnico y científico, en función de las necesidades observadas y según lo propongan los directores de departamento. Esta capacitación se ofrece como un medio de contribuir al éxito del sistema de control de la calidad. Se debe elaborar un programa de educación continua que comprenda capacitación local y externa. Es preciso conservar la documentación que describa el programa de capacitación del personal.

El programa de recursos humanos debe comprender la evaluación técnica del personal y el seguimiento del desempeño de cada funcionario, con base en la descripción del puesto. Este sistema permite la corrección de errores o deficiencias y también se puede usar como un instrumento de promoción, cuando se justifique.

8.1.4 Asignación de espacios

El laboratorio de sarampión y rubéola debe poseer espacio suficiente a fin de realizar con seguridad todas las actividades, almacenar todo el equipo necesario y facilitar la limpieza y el mantenimiento. Debe existir un número suficiente de espacios que permitan la separación de las actividades infecciosas y no infecciosas. El cultivo celular y la preparación de los medios se deben separar en lo posible de todas las demás actividades y ubicarlos preferentemente en un recinto o recintos completamente aislados, donde se lleven a cabo actividades con virus u otros microorganismos. Debe existir una demarcación clara de las diferentes zonas de trabajo, con el objeto de reducir al mínimo la posibilidad de contaminación de las zonas limpias. Si fuese posible, debería existir una ubicación lógica de las actividades del laboratorio a fin de reducir al mínimo la distancia que deben recorrer los materiales infecciosos y procurar que el material infeccioso no circule por las zonas limpias. Cuando el espacio lo permita, se deben asignar espacios específicos y preferentemente habitaciones específicas:

- al almacenamiento de reactivos y de bienes consumibles;
- a los instrumentos y equipos;
- al lavado, preparación y esterilización (limpio y sucio);
- a las pruebas serológicas;
- al cultivo celular;
- al recibo y registro de muestras;

- al procesamiento de las muestras;
- a la siembra, recolección y tipificación;
- a las actividades especializadas;
- a la documentación, archivos y el control;
- a las actividades administrativas;
- a la eliminación de desechos contaminados y de desechos clínicos.

Las siguientes son las características generales que deben cumplir las áreas del laboratorio:

- La iluminación y la ventilación se deben adaptar a las necesidades de cada área de trabajo, según los requisitos específicos de la actividad realizada. Las superficies de las mesas de trabajo deben ser lisas, de limpieza fácil y de un material resistente a los productos químicos.
- Los sistemas de seguridad deben cubrir emergencias de incendio y eléctricas y se debe contar con instalaciones de duchas y lavado de los ojos de emergencia.
- Las instalaciones de agua caliente y fría, de agua tratada, vacío, gases, vapor y electricidad se deben disponer de manera que garanticen su uso adecuado durante el trabajo y también faciliten las operaciones de mantenimiento y reparación. Las instalaciones eléctricas se deben organizar de manera que no representen ningún riesgo para los trabajadores; los alambres eléctricos no deben cruzar los pasillos. Es aconsejable un generador eléctrico de reserva que alimente los equipos esenciales como las incubadoras, los gabinetes de bioseguridad, los congeladores, etc., en particular cuando el aprovisionamiento de energía es imprevisible.
- El espacio de almacenamiento debe ser suficiente con el fin de contener los insumos de uso inmediato y evitar su acumulación en mesas de trabajo y en los pasillos. También se debe suministrar espacio adicional de almacenamiento a largo plazo, convenientemente ubicado fuera de las áreas de trabajo.
- Cada habitación del laboratorio debe contar con lavabos de agua corriente, si fuese posible, y preferentemente cerca de la puerta.
- Se debe contar con una autoclave en el mismo edificio del laboratorio.
- Deben existir locales destinados a conservar las prendas de vestir y los artículos personales exteriores y también espacios destinados al consumo de alimentos y bebidas, por fuera de las zonas de trabajo.

La instalación del equipo y la organización de los laboratorios deben tener en cuenta las normas de bioseguridad y todas las demás normas de seguridad.

8.2 Procedimientos estandarizados de trabajo

Los procedimientos normalizados de trabajo describen detalladamente las actividades realizadas en el laboratorio con el fin de:

- aportar uniformidad, regularidad y fiabilidad en cada una de las actividades realizadas en el laboratorio;
- reducir los errores sistemáticos;
- impartir capacitación y orientación al personal nuevo.

Los procedimientos normalizados de trabajo deben ser preparados por los técnicos especializados, revisados por su supervisor inmediato y aprobados por el director del laboratorio. Deben existir procedimientos normalizados de trabajo que describan todos los procedimientos generales y estos

se deben ajustar exactamente a las recomendaciones de la OMS. En condiciones ideales estos procedimientos se redactan de la siguiente manera:

Título: Descriptivo

Código: Este código identificará:

- el laboratorio;
- el número relacionado con cada procedimiento;
- un código que identifica las modificaciones, atribuyendo 00 al documento original.

Objetivo: El objetivo descrito se debe expresar de manera clara y concisa.

Alcance: La unidad operativa que aplicará el procedimiento y su campo de aplicación.

Definiciones: Se debe enunciar el significado de los principales términos empleados en el procedimiento.

Descripción general: Cada procedimiento se debe redactar en forma clara, sin ambigüedad, de manera que sea comprensible al personal con experiencia y sin ella. Cada etapa en la realización de la actividad reglamentada por el procedimiento se debe describir minuciosamente. Se pueden emplear diagramas de flujo a fin de complementar la descripción.

Condiciones de seguridad: Éstas corresponden a las medidas de seguridad y a las condiciones que se deben tener presentes en la correcta ejecución de los procedimientos. Se deben incluir las hojas de especificaciones técnicas de seguridad de los productos químicos peligrosos utilizados.

Documentación: Se debe consignar el formulario o protocolo en el cual se registrarán los datos y mediciones implicadas en los procedimientos.

Bibliografía y documentos: Publicaciones y documentos consultados en la redacción de los procedimientos normalizados de trabajo.

8.3 Documentación

La documentación comprende el conjunto de manuales de calidad, procedimientos normalizados de trabajo, instrucciones, formularios, informes, protocolos analíticos y registro de datos que sirven como datos probatorios del control de la calidad y permiten el rastreo de los datos. En función de la complejidad del laboratorio, el departamento de garantía de la calidad o la persona designada tienen a su cargo la preparación y revisión de los documentos.

8.4 Equipo e instrumentos

El laboratorio debe contar con el equipo e instrumentos necesarios al desempeño preciso de todas las pruebas realizadas. En la medida de lo posible, el distribuidor o una persona calificada se deben ocupar de la instalación y calibración de los instrumentos y los equipos nuevos. Todos los manuales e instrucciones de manejo se deben conservar en un área accesible a todos los usuarios y establecer un calendario de mantenimiento y calibración. Todos los usuarios deben conocer perfectamente los procedimientos operativos de mantenimiento y validación a fin de obtener un correcto funcionamiento. La documentación de todos los problemas de funcionamiento, de mantenimiento y de actividades de validación se debe consignar en un registro central.

En el laboratorio debe existir una lista de equipos e instrumentos que comprenda:

- el nombre;
- la marca;

- el donante o proveedor;
- la empresa de mantenimiento;
- el calendario de mantenimiento;
- el número de inventario;
- el número de serie;
- el modelo y el año;
- la ubicación;
- la fecha de compra;
- la fecha del primer uso;
- una copia del manual del fabricante.

8.5 Insumos

8.5.1 Materiales de referencia

Los materiales de referencia comprenden el material utilizado en la calibración de los procedimientos de las pruebas y en la obtención de uniformidad en la determinación de la actividad como sueros de referencia positivos y negativos o los controles de la RCP-TR. Se debe mantener un registro central o un cuaderno de anotaciones que contenga:

- el nombre del material de referencia;
- el proveedor;
- el origen;
- el número de lote;
- la fecha del análisis de verificación de los requisitos estipulados;
- el lugar y condiciones del almacenamiento;
- la fecha de caducidad, si corresponde;
- el almacenamiento en una forma apropiada (según los procedimientos uniformizados de trabajo).

Este registro debe contener toda la información relativa a las propiedades del material de referencia. La calidad del material de referencia se debe verificar cuando se hayan modificado las condiciones y en forma sistemática una vez por año.

8.5.2 Reactivos (incluidos los kits de diagnóstico)

Los reactivos se pueden definir como materiales de origen químico o biológico usados en los análisis de laboratorio. En el laboratorio debe existir en todo momento una reserva de reactivos como mínimo de seis meses. Considerando los largos plazos de entrega y la dificultad del transporte en algunas regiones, los reactivos se deben pedir con 6 a 12 meses de antelación. En aquellos laboratorios que realizan en forma sistemática el aislamiento viral, el medio de cultivo celular se considera como un reactivo.

Se debe mantener un registro central o un cuaderno de anotaciones que contenga:

- el nombre del material de referencia;
- el proveedor;
- el origen;

- el número de lote;
- la fecha del análisis de verificación de los requisitos estipulados;
- el lugar y condiciones del almacenamiento;
- la fecha de caducidad, si corresponde;
- el almacenamiento en una forma apropiada (según los procedimientos uniformizados de trabajo).

Este registro debe contener toda la información relativa a las propiedades del material de referencia. La calidad del material de referencia se debe verificar cuando se hayan modificado las condiciones y en forma sistemática una vez por año.

Características de los reactivos:

- Deben ser de calidad apropiada.
- Se deben adquirir a partir de proveedores recomendados, en su embalaje original.
- Se debe mantener un registro de adquisición, recepción y distribución a fin de garantizar la continuidad, en particular de las sustancias que precisan adquisición anticipada.
- Se deben inspeccionar a fin de verificar que los sellos están intactos cuando se reciben en la bodega o cuando se distribuyen al laboratorio. Estas inspecciones se consignan en la etiqueta con las iniciales de la persona encargada y la fecha.
- Debe existir un protocolo normalizado de trabajo específico sobre el transporte, el almacenamiento y la manipulación de los reactivos y su eliminación.

Toda modificación en la composición de los reactivos, los medios o los números de lote de los productos biológicos (antisueros, conjugados, etc.) debe estar documentada íntegramente en el registro central o el cuaderno de anotaciones. El agua se debe considerar como un reactivo y debe cumplir con las especificaciones de pureza u otros requisitos técnicos para su uso en el laboratorio.

Los reactivos preparados en el laboratorio deben estar en conformidad con los procedimientos escritos y, si corresponde, con las recomendaciones habituales de la OMS. Se validan y rotulan en forma apropiada, consignando:

- la identificación del reactivo;
- la concentración;
- la preparación y la fecha de caducidad;
- las condiciones de almacenamiento;
- las iniciales del técnico encargado.

8.6 Seguridad de laboratorio

En cada laboratorio debe estar accesible el *Manual de bioseguridad en el laboratorio de la OMS* (OMS/CDS/CSR/LYO/2004.11), consultable en :
<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/en/Biosafety7.pdf>).

En este manual se describen las técnicas esenciales de bioseguridad, los requisitos de seguridad química, eléctrica y contra incendios a fin de proteger al personal, la comunidad y el medio ambiente. Todo el personal debe conocer el contenido de este manual y debe actuar en consecuencia. Todo personal nuevo debe adquirir conciencia de los riesgos incurridos al trabajar en un laboratorio de sarampión y rubéola antes de comenzar trabajo en el laboratorio y tiene que haber

leído el manual de bioseguridad. El director tiene a su cargo la instauración y el cumplimiento de las disposiciones del manual.

El principal riesgo del personal en un laboratorio de sarampión y rubéola corresponde a la manipulación de las muestras de suero. El suero se debe considerar siempre como un material potencialmente infeccioso y el personal debe usar guantes al abrir los paquetes que lo contienen, al sacar alícuotas o transferir las muestras y al realizar las pruebas. El personal que recibe y desembala las muestras debe ser consciente de los posibles riesgos sanitarios implicados y debe recibir capacitación con el fin de adoptar las precauciones habituales, en particular cuando se trata de envases rotos o con fugas. Los envases primarios de la muestra se deben abrir en un gabinete de bioseguridad, siempre que sea posible. Se debe contar con desinfectantes al alcance, en el caso de fugas.

Todo el personal de laboratorio se debe vacunar contra la hepatitis B. Se debe pensar en la posibilidad de vacunación antisarampionosa y antirrubéolica, especialmente en laboratorios que intentan cultivar el virus del sarampión o de la rubéola a partir de muestras clínicas. Las mujeres en edad fértil que trabajan en el laboratorio de sarampión y rubéola deben tener inmunidad demostrable contra la rubéola.

8.7 Acreditación anual

La acreditación certifica que el laboratorio cuenta con los medios y la capacidad de detectar, identificar y notificar de inmediato las muestras positivas de sarampión o de rubéola. El dispositivo de acreditación brinda además una oportunidad de aprendizaje, un mecanismo de detección de las necesidades de recursos y capacitación, una medida del progreso y un vínculo con la Red Mundial de Laboratorios de la OMS.

La Oficina Regional de la OMS examina cada año la acreditación de los laboratorios nacionales de sarampión y rubéola, con base en el desempeño del laboratorio durante los 12 meses que preceden con datos completos, generalmente desde 13 meses hasta 1 mes antes de la evaluación. La acreditación se otorga para el siguiente año calendario.

Existen seis criterios de acreditación de los laboratorios nacionales:

El laboratorio notifica los resultados de las pruebas de por lo menos 80 % de las muestras de IgM de sarampión en los 7 días que siguen a su recibo.

- Con el fin de aportar una respuesta apropiada a los casos de sarampión, todos los resultados de la prueba se deben notificar al programa ampliado de inmunización en forma oportuna.

Las pruebas serológicas se realizan como mínimo en 50 muestras de suero cada año.

- Con el fin de mantener la pericia en la realización pruebas serológicas, los laboratorios de virus deben contar con reactivos y kits de pruebas suficientes, que les permitan llevar a cabo los análisis durante todo el año. Se prevé que a fin de conservar la pericia, los laboratorios analizarán un mínimo de 50 muestras séricas repartidas a lo largo del año.

La exactitud de la detección de IgM de sarampión y de rubéola es como mínimo del 90%.

- La exactitud se determina mediante la concordancia de los resultados de la prueba practicada en sueros enviados por el laboratorio nacional, al laboratorio regional de referencia durante el período de 12 meses estudiado. El porcentaje de muestras enviadas con fines de validación depende de la calidad del laboratorio y puede ir del 10 al 100%; los niveles inferiores corresponden a un laboratorio plenamente

acreditado y el 100% a un laboratorio que no obtuvo la acreditación. Las muestras de validación deben ser representativas de todos los resultados (positivo, negativo y equivoco) y de los brotes epidémicos y se deben enviar al laboratorio regional de referencia con intervalos regulares.

Se ejecutan procedimientos internos de control de la calidad de los ensayos de IgM.

- El laboratorio cuenta con procedimientos apropiados de control de la calidad y los aplica, incluidos los controles séricos pertinentes, la calibración de la micropipeta y el registro de temperatura de las incubadoras, frigoríficos y congeladores. Las fichas de control de la calidad y los resúmenes de las medidas correctivas se conservan y están accesibles para la evaluación.

La puntuación en la prueba de competencia más reciente aprobada por la OMS es como mínimo del 90%.

- Con el fin de recibir crédito total, los resultados de la prueba de competencia se deben comunicar en los 10 días que siguen al recibo de las series o paneles.

La puntuación de la evaluación anual en el terreno de los procedimientos operativos y de las prácticas es como mínimo del 80%.

Se puede omitir la evaluación en el terreno de los laboratorios nacionales que obtienen en forma reiterada indicadores de alto desempeño, cuando un laboratorio completa en forma satisfactoria la lista de verificación anual.

A los laboratorios regionales de referencia se aplica una evaluación anual de acreditación equivalente, en la cual se examinan los siguientes siete criterios:

Los resultados de confirmación de por lo menos 80% de las muestras enviadas por los laboratorios nacionales se comunican en los 14 días que siguen a su recibo.

- A fin de procurar que los laboratorios nacionales reciban una respuesta oportuna a todos los resultados de las pruebas de validación.

Las pruebas serológicas se realizan como mínimo en 50 muestras séricas cada año.

- Con el fin de mantener la pericia en la realización de pruebas serológicas, los laboratorios de virus deben contar con reactivos y kits de pruebas suficientes, que les permitan llevar a cabo los análisis durante todo el año.

La puntuación en la prueba de competencia más reciente aprobada por la OMS es como mínimo del 90%.

- Con el fin de recibir crédito total, los resultados de la prueba de competencia se deben comunicar en los 10 días que siguen al recibo de las series o paneles.

El laboratorio cuenta con procedimientos internos de control de calidad.

- El laboratorio cuenta con procedimientos apropiados de control de calidad y los aplica, incluidos los controles séricos pertinentes, la calibración de la micropipeta y el registro de temperatura de las incubadoras, frigoríficos y congeladores. Las fichas de control de calidad y los resúmenes de las medidas correctivas se conservan y están accesibles para la evaluación.

En los laboratorios regionales de referencia que sirven también como laboratorios nacionales:

El laboratorio notifica los resultados de las pruebas de por lo menos 80 % de muestras de IgM de sarampión en los 7 días que siguen a su recibo.

- Con el fin de aportar una respuesta apropiada a los casos de sarampión, todos los resultados de la prueba se deben notificar al programa ampliado de inmunización en forma oportuna.

En los laboratorios que realizan el genotipado del virus del sarampión, de la rubéola o ambos:

El genotipado se completa en los 2 meses que siguen a la recepción de la muestra de virus y los datos del genotipo se notifican mensualmente a la Oficina Regional de la OMS que corresponde (incluidas las notificaciones negativas), como mínimo en 80% de las muestras virales recibidas.

- La información del genotipo puede contribuir a la determinación de las vías de transmisión, por parte de los programas nacionales de control, y se debe suministrar en forma oportuna. Asimismo, se recomienda a los laboratorios que presenten los datos de secuencia al GenBank una vez que la secuenciación está completa.

La puntuación de la evaluación anual en el terreno de los procedimientos operativos y de las prácticas es como mínimo del 90%.

En los laboratorios regionales de referencia que obtienen indicadores de buen desempeño en forma reiterada, el coordinador mundial de laboratorios puede renunciar al examen en terreno, cuando el laboratorio completa en forma satisfactoria la lista de verificación anual (véase más adelante).

Un laboratorio que obtiene una puntuación inferior a la aprobatoria en cualquiera de los criterios aplicables, trabajará con el coordinador de laboratorios con el fin de:

- definir las áreas que precisan mejoramientos,
- elaborar e implementar un plan de trabajo,
- supervisar el progreso del laboratorio,
- prever una nueva evaluación cuando sea necesaria; y
- continuar las etapas a fin de lograr la acreditación completa.

Se considera que un laboratorio que no alcanza la puntuación aprobatoria en la prueba de competencia en los 6 meses que siguen al examen anual no está acreditado. Se debe tomar las disposiciones necesarias de manera que un laboratorio acreditado realice en duplicado el análisis de todas sus muestras.

Todos los laboratorios se deben evaluar anualmente, pero el coordinador de laboratorios de sarampión puede dispensar de evaluación **anual** en el terreno a los laboratorios con una puntuación de acreditación reiteradamente alta y determinar su estado de acreditación tras el examen de los demás indicadores de desempeño. En esta situación, las evaluaciones en el terreno de los laboratorios con buen rendimiento se pueden llevar a cabo cada dos a cuatro ciclos de acreditación.

9. Anexos

9.1 Modelo del formulario de solicitud de los laboratorios de sarampión y de rubéola

Formulario de solicitud del laboratorio de sarampión y rubéola			
País:		Fecha ² :	Identificación del paciente ¹ :
Nombre del paciente:		M	F
Edad en meses:	Nombre del padre/madre o tutor:		
Dirección:			
Número de dosis de vacuna contra el sarampión:		Fecha de la última dosis recibida:	
Número de dosis de vacuna contra la rubéola:		Fecha de la última dosis recibida:	
Fecha de aparición de la fiebre:		Fecha de aparición del exantema:	
Diagnóstico clínico presuntivo:			
Identificación de la muestra ¹	Tipo de muestra ³	Fecha de recogida	Fecha de envío
1)			
2)			
3)			
Observaciones adicionales sobre el paciente o sobre las muestras ⁴ :			
Nombre de la persona a quien se deben enviar los resultados de laboratorio:			
Dirección:			
Número de teléfono:		Número de fax:	
Para uso del laboratorio destinatario			
Nombre de la persona que recibe la muestra:			
Identificación de la muestra, tal como está escrita en la muestra ⁵	Tipo de muestra	Fecha de recibo	Estado a la recepción ⁶
1)			
2)			
3)			
Observaciones adicionales:			
Identificación de	Tipo de muestra	Medidas preparatorias realizadas al recibir la muestra en el laboratorio ⁷	
1)			
2)			
3)			

Notas:

- ¹ Los formatos referentes a los nombres de país, la identificación de pacientes y el tipo de muestras se deben acordar con antelación con la Oficina Regional de la OMS y usarlas sistemáticamente.
- ² Se debe usar el mismo formato de fecha en forma homogénea; se usará preferentemente el mismo formato (por ejemplo, dd-mm-aa) en toda la Región. La Oficina Regional de la OMS suministrará orientación sobre el formato preferido.
- ³ El tipo de muestra puede incluir: suero, sangre completa (con EDTA, heparinizada), gota de sangre seca en papel filtro, hisopo (secreciones bucales, garganta, nasal), aspirado (nasofaríngeo, respiratorio), orina (muestra completa, sedimentada por centrifugación) y otros.

- ⁴ Cualquier observación adicional sobre el paciente o las muestras recogidas, que pueda ser de importancia en la investigación epidemiológica o al laboratorio como paciente fallecido; relación del paciente con otro caso investigado; segunda serie de muestras recogidas del mismo paciente; muestras expuestas a condiciones inadecuadas antes del envío; etc.
- ⁵ Consignar la identificación de la muestra exactamente como está escrita en el envase, a fin de confirmar que esta identificación coincide con la asignada por el investigador del caso.
- ⁶ Confirmar que la muestra se recibió en buen estado o consignar la condición inapropiada o deficiente del recibo. Esta información se debe transmitir al investigador del caso o a la persona encargada del envío de la muestra.
- ⁷ Esta información es de particular importancia en las muestras recibidas con fines de aislamiento viral, pero se aplica a todas las muestras recibidas. Ejemplos de entradas pueden ser almacenada en un frigorífico de muestras; almacenada en un congelador de muestras; procesada a fin de separar la sangre, orina centrifugada, etc.

9.2 Extracción de IgM específica del sarampión a partir de muestras de sangre seca en papel filtro y detección utilizando el ensayo indirecto de anticuerpos IgM del sarampión de Dade Behring (según [39])

9.2.1 Preparación de reactivos:

La solución de extracción que contiene leche descremada se debe preparar con antelación. Con el fin de preparar 100 ml de la solución de extracción usar:

Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS)	100 ml
Polisorbato 20 al 0,5 %	500 µl
Leche descremada en polvo (grado de transferencia, no leche entera en polvo)	5 g

- Disolver la leche en polvo revolviendo en un agitador magnético caliente (alrededor de 50°C) durante 15 a 30 minutos (no dejar hervir), permitir que recupere la temperatura ambiente antes de usarla.
- Almacenar la solución de extracción a 4°C como máximo una semana o distribuir en alícuotas de 10 o 50 ml y congelar a -20°C.

(Descongelar las alícuotas entre 45 y 50°C de manera que la leche se disuelva totalmente y que no haya ninguna partícula en el diluyente.)

9.2.2 Elución de la mancha de sangre

- Obtener tres (3) discos de sangre seca de la mancha de sangre con una perforadora (discos de 3 x 6 mm).
- Colocar los tres discos en un pozo limpio y seco de una placa de microtitulación de fondo plano o en un tubo Eppendorf de fondo redondo (o equivalente).
- Agregar 330 µl de solución de extracción.
- (Esto equivale a una dilución de 1:23 suponiendo que cada disco de 6 mm contiene aproximadamente 5 µl de suero. Es decir, 15 µl equivalentes de suero en 330 µl de diluyente).
- Cubrir la placa y agitar en un agitador de bandeja o de rotor durante 15 minutos a temperatura ambiente. (Con los tubos Eppendorf utilizar un agitador vorticial durante 30 segundos, incubar 15 minutos a temperatura ambiente y agitar de nuevo antes de incubar hasta el día siguiente a 4°C).
- Sellara la placa, colocarla en ambiente húmedo en una caja hermética (caja plástica con tapa ajustada) e incubarla hasta el día siguiente a 4°C.

9.2.3 Absorción del eluido

- Agitar la placa durante 15 minutos a temperatura ambiente (los tubos Eppendorf en agitadora vorticial durante 30 segundos).
- Centrifugar la placa o los tubos a cerca de 3.800 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente (esto sedimenta todas las partículas en el fondo del pozo de microtitulación, incluidos los discos, a fin de facilitar la recuperación del eluido).
- Extraer 170 µl de eluido y mezclar con 170 µl de absorbente del factor reumatoideo, provisto en el kit de Dade Behring y preparado según se indica en las instrucciones del kit. La dilución final de la muestra debe ser de 1:46.

9.2.4 Protocolo del inmunoensayo (sólo para análisis de sangre seca en papel filtro)

- Para cada serie de pruebas, preparar un tubo con el control negativo (P/N) y 2 tubos con el control testigo de la prueba (P/P).
- Pipetear 150 µl de P/N y P/P en los pozos del antígeno del sarampión y del antígeno control a partir de los tubos de dilución inicial (1:21) en la primera y segunda posición. No agregar P/P a los pozos de la última posición hasta terminar de distribuir el eluido.
- Transferir 150 µl de la mezcla de eluido con absorbente del factor reumatoideo en los pozos controles y de prueba (véase figura 15).
- Incubar a 37°C durante 1,5 horas (Nota: esto es 30 minutos más que en el ensayo regular de Dade Behring para suero).
- Lavar cinco veces con un tiempo de permanencia de 1 a 2 minutos con la solución de lavado de Behring (provisto con el kit complementario) (Nota: esto es una vez más que en el análisis regular).
- Reconstituir el conjugado anti-IgM específico del sarampión según las instrucciones del kit y distribuir 100 µl en los pozos de prueba y en los pozos control.
- Incubar el conjugado durante 1,5 horas a 37°C. (Nota: esto es 30 minutos más que el análisis regular de Behring para suero)
- Lavar cinco veces como anteriormente y completar la prueba con el sustrato y la solución de parada según las instrucciones del kit.
- Leer a 450 nm (usando como longitud de onda de referencia 650 nm).

9.2.5 Determinación de los resultados

Consultar el manual y el prospecto del kit sobre los criterios de validación. Consignar los resultados de validación con sus resultados.

Con cada muestra evaluada y también con las muestras de referencia se calcula la diferencia (ΔA) entre la medida en el pozo del antígeno del sarampión y el pozo del antígeno control:

$$\Delta A = A_{\text{antígeno del sarampión}} - A_{\text{antígeno testigo}}$$

Una serie se considera válida en el ensayo de Behring Dade, cuando se reúnen las siguientes condiciones:

- el ΔA del control negativo (P/N) es $< 0,10$;
- el ΔA de cada uno de los controles positivos (P/P₁ y P/P₂) es $> 0,2$;
- el ΔA de cada uno de los controles positivos (P/P₁ y P/P₂) se debe encontrar dentro del límite superior y el inferior especificados (véanse los valores del prospecto del kit);
- el ΔA de cada uno de los P/P no se debe desviar más del 20 % de la media de ambos P/P; y
- Las muestras de sangre seca cuyo pozo control tiene una densidad óptica superior a 0,15 se deben analizar de nuevo.

9.2.6 Interpretación de los resultados

Los siguientes son los criterios requeridos a fin de definir una muestra como positiva, negativa o equívoca para la IgM específica del sarampión:

IgM específica del sarampión positiva:	$\Delta A > 0,20$
IgM específica del sarampión negativa:	$\Delta A < 0,10$
IgM específica del sarampión equívoca:	$\Delta A \geq 0,10$ y $\leq 0,20$

- Las muestras con una $\Delta A \geq 0,1$ y $\leq 0,2$ se deben analizar nuevamente, después de eluir de nuevo la gota de sangre seca.

9.2.7 Observación referente a la IgM específica contra la rubéola a partir de muestras de sangre seca.

- Existen cada vez más indicios de que protocolos similares al descrito anteriormente serán útiles en el diagnóstico de casos de rubéola [41, 42], pero los protocolos óptimos aún no están definidos.

9.3 Control de calidad y resolución de problemas de las pruebas serológicas de sarampión y rubéola

9.3.1 Control de calidad

Cada prueba posee un conjunto específico de criterios de control de calidad que se deben satisfacer antes de considerar un análisis válido. Es esencial cumplir con las normas de control de la calidad de las instrucciones suministradas por el fabricante de la prueba en cada serie de ensayos.

Asimismo, es útil que el laboratorio cuente con un conjunto de sueros control positivos y negativos que se analizarán con las muestras de pacientes a intervalos regulares. Estas muestras internas pueden ser útiles en la comparación de la variabilidad entre los lotes de kits, en la detección de los problemas de la prueba y en la solución de los mismos. Con el fin de proteger su estabilidad, los sueros internos de referencia, se deben distribuir en alícuotas de un volumen de uso único y almacenar a -20°C o menos. Lo ideal es seleccionar sueros internos con un volumen suficiente que permita obtener la cantidad de alícuotas necesaria para realizar pruebas al menos cada 2 a 4 semanas durante un período de 12 meses. El trazado de los valores de absorbencia de los controles del kit y de los controles internos en una gráfica facilita la supervisión de la homogeneidad de las pruebas ELISA que se practican en cada laboratorio y la detección temprana los problemas de la prueba; también se pueden usar en la evaluación del desempeño individual de los técnicos.

A continuación se presentan a título de ejemplo las medidas de control de calidad requeridas con el ensayo de IgM de sarampión y de rubéola de Dade Behring:

Con cada muestra que se examina y con las muestras de referencia se calcula la diferencia (ΔA) entre la absorbencia medida en el pozo del antígeno del sarampión y el pozo del antígeno control:

$$\Delta A = A_{\text{antígeno del sarampión}} - A_{\text{antígeno control}}$$

Una serie se considera válida en el ensayo de Behring Dade, cuando se reúnen las siguientes condiciones:

- El kit no se ha usado después de su fecha de caducidad;
- el ΔA del control negativo (P/N) es $<0,10$;
- el ΔA de cada uno de los controles positivos (P/P₁ y P/P₂) es $>0,2$;
- el ΔA de cada uno de los controles positivos (P/P₁ y P/P₂) se encuentra dentro del límite superior y el inferior especificados (véanse los valores del prospecto del kit);
- el ΔA de cada uno de los P/P no se desvía más del 20% de la media de los controles positivos (P/P₁ y P/P₂). Por ejemplo:
 - cuando $\Delta A P/P_1 = 0,488$ y $\Delta A P/P_2 = 0,452$
 - la media de $\Delta A P/P = (\Delta A P/P_1 + \Delta A P/P_2) / 2 = 0,470$ (en el ejemplo anterior)
 - 20% de la media = Media de la $\Delta A P/P_{1+2} \times 0,2 = 0,470 \times 0,2 = 0,094$ (en el ejemplo anterior)
 - cada $\Delta A P/P$ está dentro de los valores: $\pm 20\%$ de la media de $\Delta A P/P_{1+2}$
 - o entre $0,376$ y $0,564$ (en el ejemplo anterior)

Cuando una prueba no es válida, es necesario verificar todos los reactivos y las etapas del procedimiento con el fin de determinar el problema. Cuando el problema no se puede detectar con certeza, es esencial investigar la prueba etapa por etapa, examinando o resolviendo cada variable individualmente. Los controles internos representan muestras valiosas con este

propósito. A continuación se presentan algunas directrices generales destinadas a evitar y a resolver los problemas con los ensayos inmunoenzimáticos.

9.3.2 Solución de problemas de los ensayos inmunoenzimáticos

Problemas de reactivos

- Verificar que todos los reactivos y las muestras se han almacenado correctamente, que no se han contaminado y que no se ha cumplido su fecha de caducidad.
- Rotular todos los reactivos y anotar la fecha de preparación y reconstitución.
- Conservar durante la prueba un ritmo constante de adición de los reactivos y procesar las placas en un orden uniforme durante todas las etapas del procedimiento.
- Usar regularmente una muestra interna de control de calidad con un valor conocido de absorbencia.
- Evitar los ciclos repetidos de congelación y descongelación de los sueros, especialmente de aquellos usados como controles de calidad internos. Cuando se precisa congelar las muestras de control interno, se deben hacer múltiples alícuotas con volúmenes de uso único.

Errores del operador, mecánicos o de procedimiento

- Verificar que se sigan exactamente los protocolos de análisis, en particular las temperaturas y los tiempos de incubación. Estar alerta a posibles cambios en los protocolos de las pruebas. Las instrucciones del fabricante se deben leer con cada nuevo lote de pruebas, ajustando los procedimientos normalizados de trabajo según se requiere.
- Supervisar y registrar diariamente la temperatura de los frigoríficos, los congeladores y las incubadoras.
- Verificar que se practican procedimientos correctos de lavado. Una deficiencia en los lavados puede dar lugar a una alta señal de fondo y un exceso de los mismos puede provocar una baja absorbencia. Cumplir exactamente con la cantidad recomendada de ciclos de lavado y con el tiempo de permanencia de la solución de lavado (cronometrar el tiempo que permanece la solución de lavado en los pozos durante cada ciclo).
- Verificar que todos los canales del lavador de placas ELISA funcionan correctamente y no están bloqueados. Enjuagar el lavador con agua destilada después de cada uso a fin de evitar la cristalización de sal en el cabezal dispensador. Un canal bloqueado puede generar una alta absorbencia de fondo en cada pozo de una fila o de una columna.
- Verificar que se emplea el filtro correcto en el lector de ELISA con el sustrato apropiado (por ejemplo: 405 nm para el ABTS [ácido 2,2'-azino-bis 3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico], 450 nm para TMB [tetrametil-bencidina], 492 nm para OPD [orto-fenildiamina]). Leer la placa con otro lector de ELISA o ensayar otros filtros cuando los cambios visuales de color no coinciden con las lecturas de absorbencia en el lector de ELISA. El uso de un lector de ELISA de longitud de onda dual disminuye la posible influencia de componentes diferentes al sustrato sobre las lecturas de absorbencia. Para un sustrato TMB (longitud de onda óptima del filtro 450 nm) la longitud de onda apropiada del filtro de referencia sería 630 nm.
- Cuando no se opera ningún cambio de color en la prueba, el problema puede ser el conjugado, el sustrato o ambos. Una forma rápida de localizar el problema puede ser mezclar aproximadamente 10 µl de conjugado correctamente diluido con 100 µl de sustrato diluido y observar si aparece el color. Se recomienda usar en la dilución del

conjugado y del sustrato envases plásticos con baja fijación de proteínas, pues algunos envases de vidrio pueden inhibir la reacción enzimática, al igual que los residuos de productos de limpieza.

- Verificar que el pH de la solución de dilución y solución de lavado es óptimo. Usar siempre agua recién destilada en la preparación de reactivos y soluciones de lavado y verificar que el pH está de acuerdo con el protocolo.
- Cuando una placa se ha dejado secar durante el procedimiento de lavado, se pueden producir uniones inespecíficas con el consiguiente problema de una alta señal de fondo.
- Verificar de que las diluciones de reactivos se calcularon correctamente, calculándolas todas de nuevo y solicitando a otra persona que las verifique.
- Registrar los datos de la prueba de desempeño en un cuaderno de registro de laboratorio, consignando:
 - el número de lote del kit o kits con su fecha de caducidad;
 - la fecha de la prueba;
 - el nombre de la persona que realiza el análisis;
 - el nombre de la persona que verifica los resultados (generalmente el supervisor del laboratorio);
 - los cálculos de datos del análisis, las diluciones, la hora de comienzo y de final de cada incubación;
 - cualquier otra observación, los errores, los cambios involuntarios;
 - los controles positivo y negativo y los datos de control de calidad; y
 - los datos brutos (sin procesar) de absorbencia.

Inexactitudes de la micropipeta

- Limpiar y verificar periódicamente (al menos cada 3 meses) la exactitud de las pipetas que se usan en la prueba. Es posible reducir al mínimo las inexactitudes relativas a la micropipeta con un uso correcto (véase prospecto de la micropipeta), verificando que el cono portapuntas permanezca limpio, en particular donde se ajustan las puntas y evitando que se introduzcan las muestras en el cono. El exterior del cono se debe limpiar después de cada uso con una tela suave impregnada con etanol al 70%. El cono y el pistón se pueden limpiar de la misma manera cada mes, una vez que un técnico experimentado ha desmontado la pipeta.
- El volumen distribuido por una micropipeta se puede evaluar determinando el peso de una serie de volúmenes fijos de agua destilada en una balanza analítica.
- El agua destilada tiene una densidad de 1 µl por 1 mg a 4°C y a una presión atmosférica de 1 atmósfera (o 1013,25 hectopascales [hPa]). En el cuadro 8 se presenta la densidad del agua a temperaturas y presiones atmosféricas diferentes.
- Se debería lograr una exactitud superior al 98% en cada entrega de la micropipeta; sin embargo, es útil verificar el prospecto del instrumento suministrado por el fabricante. Antes de proceder, es esencial haber calibrado la balanza, que sea exacta y que idealmente pueda medir hasta 3 o 4 decimales (es decir, 0,000 g o 0,0001 g).
- Usar una pipeta del volumen apropiado a cada medición:
 - entre 1 y 10 µl, usar una pipeta Gilson P10 o equivalente;

- entre 5 y 20 µl, usar una pipeta Gilson P20 o equivalente;
- entre 20 y 200 µl, usar una pipeta Gilson P200 o equivalente; y
- entre 200 y 1000 µl, usar una pipeta Gilson P1000 o equivalente.

Cuadro 8. Densidad del agua a diversas temperaturas y presiones atmosf3ricas

Temperatura °C	Presi3n atmosf3rica					
	hPa					
	800	853	907	960	1013	1067
15	1,0018	1,0018	1,0019	1,0019	1,002	1,002
15,5	1,0018	1,0019	1,0019	1,002	1,002	1,0021
16	1,0019	1,002	1,002	1,0021	1,0021	1,0022
16,5	1,002	1,002	1,0021	1,0022	1,0022	1,0023
17	1,0021	1,0021	1,0022	1,0022	1,0023	1,0023
17,5	1,0022	1,0022	1,0023	1,0023	1,0024	1,0024
18	1,0022	1,0023	1,0024	1,0024	1,0025	1,0025
18,5	1,0023	1,0024	1,0025	1,0025	1,0026	1,0026
19	1,0024	1,0025	1,0025	1,0026	1,0027	1,0027
19,5	1,0025	1,0026	1,0026	1,0027	1,0028	1,0028
20	1,0026	1,0027	1,0027	1,0028	1,0029	1,0029
20,5	1,0027	1,0028	1,0028	1,0029	1,003	1,003
21	1,0028	1,0029	1,003	1,003	1,0031	1,0031
21,5	1,003	1,003	1,0031	1,0031	1,0032	1,0032
22	1,0031	1,0031	1,0032	1,0032	1,0033	1,0033
22,5	1,0032	1,0032	1,0033	1,0033	1,0034	1,0035
23	1,0033	1,0033	1,0034	1,0035	1,0035	1,0036
23,5	1,0034	1,0035	1,0035	1,0036	1,0036	1,0037
24	1,0035	1,0036	1,0036	1,0037	1,0038	1,0038
24,5	1,0037	1,0037	1,0038	1,0038	1,0039	1,0039
25	1,0038	1,0038	1,0039	1,0039	1,004	1,0041
25,5	1,0039	1,004	1,004	1,0041	1,0041	1,0042
26	1,004	1,0041	1,0042	1,0042	1,0043	1,0043
26,5	1,0042	1,0042	1,0043	1,0043	1,0044	1,0045
27	1,0043	1,0044	1,0044	1,0045	1,0045	1,0046
27,5	1,0044	1,0045	1,0046	1,0046	1,0047	1,0047
28	1,0046	1,0046	1,0047	1,0048	1,0048	1,0049
28,5	1,0047	1,0048	1,0048	1,0049	1,005	1,005
29	1,0049	1,0049	1,005	1,005	1,0051	1,0052
29,5	1,005	1,0051	1,0051	1,0052	1,0052	1,0053
30	1,0052	1,0052	1,0053	1,0053	1,0054	1,0055

9.4 Aislamiento e identificación del virus del sarampión y de la rubéola a partir de cultivo celular

9.4.1 Recogida y envío de muestras clínicas

El tipo de muestra necesaria con el fin de aislar el virus del sarampión depende del contexto específico. En general, las muestras más accesibles son los hisopos de garganta o nasales (para sarampión y rubéola) y las muestras de orina (sólo para sarampión) y es aceptable recoger ambos tipos de muestras. Los aspirados nasofaríngeos y las muestras de sangre heparinizada son también buenas fuentes de virus, pero requieren más equipo, personal especializado y capacidad de laboratorio. **Las muestras destinadas al aislamiento viral se deben obtener lo más pronto posible después de la aparición del exantema.** Las muestras para aislamiento viral se recogen además de una muestra sérica, pero las muestras de vías respiratorias o de orina nunca deben reemplazar a las muestras séricas. A continuación se describen los protocolos.

9.4.2 Muestras de las vías respiratorias

Materiales necesarios:

- hisopos estériles (o kits comerciales de recogida de muestras con hisopo destinadas al cultivo de virus, incluido el medio de transporte de virus).
- solución salina estéril.
- alícuotas de 3 ml de medio de transporte de virus (que consiste en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) estéril o solución isotónica apropiada como la solución amortiguada de sales de Hanks, etc. con antibióticos [100 unidades por ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin] y ya sea, suero bovino fetal al 2% o gelatina al 0,5% en tubos de centrifugación).
- jeringuillas de plástico de 5 ml.
- aspiradores de plásticos o jeringa de 30 ml.
- crioviales.
- envases isotérmicos de transporte.

Obtención de muestras:

- Se debe tratar de obtener la muestra cuanto antes, después de la aparición del exantema. Muchas de las muestras de los casos son positivas cuando se recogen en los 5 días iniciales de la erupción cutánea.
- Hisopos de nariz y garganta: Se pueden usar hisopos estériles para frotar la nasofaringe y la orofaringe. Si es preciso se puede emplear un bajalenguas de madera. Colocar ambos hisopos en un tubo que contenga de 2 a 3 ml de medio de transporte de virus. El virus del sarampión se fija firmemente a las células, por lo cual es necesario frotar la pared posterior de la garganta y fosas nasales a fin de recoger células epiteliales. El hisopo se puede colocar en el tubo de medio de transporte. Romper el asa del hisopo y cerrar el tubo herméticamente.
- La muestra de lavado nasal (aspirado nasofaríngeo) es una muestra difícil de obtener, pero se puede conseguir con una jeringa conectada a un tubo plástico. Después de instilar de 3 a 5 ml de solución salina en la nariz, se aspira la máxima cantidad de material posible y se agrega al tubo de centrifuga que contiene el medio de transporte de virus. (En un consultorio o en entorno hospitalario, un dispositivo de vacío puede aumentar la recuperación del líquido.) Añadir al tubo el líquido de enjuague de la jeringa y el tubo.

- Mantener todas las muestras sobre hielo o a 4°C y despacharlas cuanto antes sobre hielo a un laboratorio apropiado, preferentemente entre 24 y 48 horas.

9.4.3 Muestras de orina

Materiales requeridos:

- Recipientes de recogida de orina, preferentemente con tapa hermética.
- tubos de centrifuga de poliestireno de 50 ml.
- Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) o medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM).
- Crioviales.
- Envases de transporte.

Obtención de muestras:

La orina se debe recoger en los primeros 5 días de iniciado el exantema (mejor entre el primero y el tercero). Las muestras de la primera micción de la mañana son ideales, pero cualquier muestra de orina es adecuada. Recoger hasta 50 ml de orina en un recipiente de muestras de orina. La orina se debe transferir a un tubo de centrifuga de 15 o 50 ml antes de enviarla.

Es mejor centrifugar la muestra de orina tan pronto como sea posible después de obtenerla. Mantener la muestra fría (refrigerador o hielo). Para el procesamiento, transferir 50 ml de la muestra a un tubo de centrifuga de plástico de 15 o 50 ml y centrifugar a 1.500 rpm durante 5 a 10 minutos a 4°C a fin de recuperar el sedimento. Desechar el sobrenadante, resuspender el sedimento en 1 a 2 ml de medio de transporte de virus o cualquier medio de cultivo celular (DMEM, medio esencial mínimo Eagle [EMEM], RPMI [Roswell Park Memorial Institute] con antibióticos) y enviar la muestra. Es preferible congelar a -70°C las muestras que se han centrifugado y resuspendido y enviarlas en nieve carbónica. Cuando no se cuenta con nieve carbónica, se pueden almacenar a 4°C y enviarlas sobre hielo.

Cuando no se puede realizar la centrifugación, **no se debe congelar la muestra de orina**. La muestra completa de orina se debe almacenar a 4°C y enviarla al laboratorio sobre hielo. Es mejor enviar la muestra en un plazo de 24 horas, de manera que se pueda procesar y congelar a -70 °C, con el objeto de optimizar la recuperación de virus, con menor probabilidad de contaminación. Cerrar el envase de la muestra herméticamente a fin de evitar las fugas.

9.4.4 Muestras de sangre

El virus también se puede aislar a partir de los linfocitos. Esta técnica no está muy difundida pues requiere una muestra de sangre adicional (con anticoagulante) y el aislamiento de linfocitos es técnicamente complejo. Sin embargo, cuando es posible obtener varios mililitros de sangre heparinizada, los linfocitos pueden ser una buena fuente de virus. La sangre se debe almacenar a 4°C y transportarse al laboratorio en un lapso de 24 a 48 horas. Los linfocitos se pueden purificar de la sangre entera usando Ficoll-Hypaque o un medio de separación de linfocitos. Véase el protocolo más adelante.

9.4.5 Envío de las muestras clínicas y de los aislados virales

El mejor método de envío de los aislados virales en cultivo de células, es remitir un frasco plástico de cultivo celular de 25 cm². Las células se deben infectar inmediatamente antes de su envío. Una vez infectadas las células (y transcurrida la hora de incubación), llenar el frasco casi hasta el borde

con DMEM (con antibióticos y suero bovino fetal al 2%) dejando una burbuja (alrededor de 0,5ml) que permita la expansión del líquido durante el transporte. Cerrar bien la tapa e impermeabilizar con plástico fino de envolver o con cinta adhesiva. Envolver el frasco en material absorbente suficiente que pueda retener la totalidad de su contenido, en caso de fugas. Colocar el frasco y el material absorbente en un recipiente a prueba de escapes como una bolsa plástica de cierre hermético y luego en un embalaje exterior hermético que cumpla con los requisitos *IP 620* de embalaje y documentación y enviar a temperatura ambiente.

Si se prefiere, las células infectadas (con sincicios en más del 50%) se pueden centrifugar, resuspendiendo el sedimento en un volumen pequeño (1 a 2 ml) de DMEM y congelar a -70°C antes de enviarlas en nieve carbónica. (Véase el apartado 9.4.11 sobre instrucciones de preparación de los patrones [“stock”] de virus).

No olvidar el uso de embalajes de envío adecuados, la obtención de licencias necesarias y la notificación al destinatario del envío. Véase [apéndice 9.5](#).

9.4.6 Procesamiento de las muestras

A medida que se registra cada muestra en el laboratorio, se consigna en el cuaderno de trabajo o en la hoja de cálculo el número de identificación y la información sobre el paciente y la muestra. Esta información puede ser útil en la detección de problemas que pueden contribuir a la pérdida de virus o a la incapacidad de aislarlos.

Datos importantes en el registro:

Información sobre el paciente	Información sobre la muestra
Edad	Tipo (hisopo de garganta, lavado nasal, orina, sangre)
Fecha de nacimiento	Fecha de recogida de la muestra
Fecha de aparición del exantema	Volumen (orina)
Fecha de la extracción sanguínea	Estado (temperatura al llegar)
Resultado de IgM	Medidas tomadas (centrifugación, ubicación de almacenamiento)
Fecha de vacunación antisarampionosa y antirrubéolica	

Aspirados o hisopos de garganta, nasales o nasofaríngeos: Cuando la muestra llega como material congelado en 2 a 3 ml de medio de cultivo celular o en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS), se puede almacenar tal como llega a -70°C o menos. Cuando se recibe el tubo original con el hisopo, agregar 2 ml de DMEM y mezclar en agitador vorticial, con el fin de recuperar el material del hisopo, permitir la elución del virus durante una hora y presionar al máximo el hisopo contra la pared del tubo. Almacenar a -70 °C.

Orina: Cuando se recibe en gran volumen, transferir a tubos de centrifuga con el fin de sedimentarla (1500 rpm, 10 minutos, 4 °C). Resuspender todo el sedimento en 1 a 2 ml de DMEM. Almacenar a -70 °C.

Sangre heparinizada: Usar un medio comercial de separación de linfocitos de sangre periférica durante la centrifugación.

Modelo del protocolo de separación de linfocitos (medio de separación de linfocitos de Organon Teknika): Diluir la sangre en una proporción de 1:1 con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS). Agregar 2 volúmenes de medio de separación de linfocitos a un tubo de centrifuga de plástico. Disponer con cuidado una capa de sangre diluida sobre el medio de separación. Centrifugar a 2,000 rpm durante 30 minutos a 20°C (con cubos pivotantes y sin freno).

Los linfocitos deben formar una banda blanca o gris sobre el sedimento de glóbulos rojos. Usando una pipeta, extraer cuidadosamente la banda de linfocitos, pasarlos a un tubo de centrifuga limpio y lavarlos con 10 a 15 ml de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS). Centrifugar los linfocitos en esta solución y resuspenderlos en un volumen pequeño (1 a 2 ml) de DMEM.

Almacenar a -70°C .

Almacenar todas las muestras a -70°C y enviarlas en nieve carbónica. Se recomienda dividir cada muestra como mínimo en dos tubos.

Las muestras clínicas no se deben filtrar sistemáticamente antes de inocular el cultivo de células. Sin embargo, cuando un cultivo se contamina después del primer intento de aislamiento, se puede filtrar la muestra restante. La muestra se filtra llevándola a un volumen de 1 a 2 ml con DMEM y filtrando el contenido a través de un filtro de nitrocelulosa ($0,45\ \mu\text{m}$) adaptado a una jeringuilla de 5 ml.

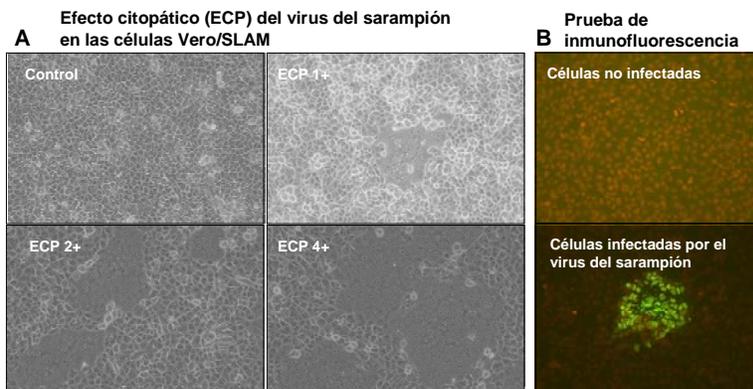
9.4.7 Introducción al cultivo celular

En la actualidad se recomienda la línea celular Vero/SLAM en el aislamiento rutinario del virus del sarampión o de la rubéola en la red de laboratorios de la OMS. Estas células son células Vero que han recibido por transfección un plásmido que codifica el gen de la proteína SLAM humana (Ono, et al., 2001). Se ha demostrado que SLAM es un receptor del virus del sarampión, de cepas salvajes y de cepas adaptadas en el laboratorio. La obtención de las células Vero/SLAM se debe al Dr. Yusuke Yanagi, de la Kyushu University, Kukuyoka, Japón. El Dr. Yanagi autorizó amablemente el uso de estas células en la red de laboratorios de sarampión y rubéola de la OMS con las siguientes condiciones:

- Que la línea celular Vero/SLAM se use sólo en el diagnóstico de laboratorio de la infección por el virus del sarampión y la rubéola mediante aislamiento viral y en la investigación de las cepas con fines de epidemiología molecular.
- Que la línea celular no se use con fines comerciales.
- Que la línea celular no se distribuya a laboratorios externos a la red de laboratorios de la OMS sin autorización del Dr. Yanagi y de la OMS.
- Que toda publicación de trabajos en los cuales se haya usado la línea celular de Vero/SLAM mencione la publicación original (Ono et al. *J. Virol.* 2001. 75:4399-4401).

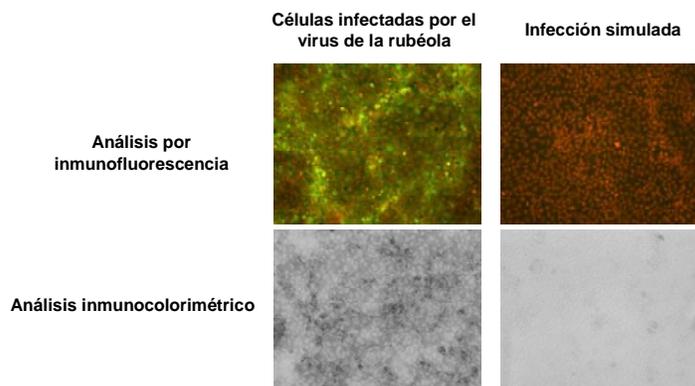
El aislamiento viral del sarampión en células Vero/SLAM ofrece una sensibilidad equivalente al aislamiento en células de B95a y su infección por el virus del sarampión provoca un efecto citopático característico, la formación de sincicios (figura 19). La ventaja de las células Vero/SLAM con respecto a las células de B95a es que no presentan una infección persistente por el virus Epstein-Barr y por consiguiente no se consideran como material peligroso. Esto confiere una ventaja de seguridad considerable a los técnicos de laboratorio y facilita en gran medida los envíos internacionales. La desventaja de las células Vero/SLAM es que se deben cultivar en un medio que contenga geneticina, a fin de conservar la expresión de la molécula activadora de la señalización del linfocito (SLAM), con lo cual se aumenta el costo del medio de cultivo. En la figura 19 se ilustra el efecto citopático del virus del sarampión de tipo salvaje en las células Vero/SLAM con los resultados de una prueba de inmunofluorescencia de confirmación del aislamiento del mismo virus.

Figura 19. La serie A muestra el efecto citopático causado por infección con el virus del sarampión en las células Vero/SLAM. En el cuadro superior izquierdo aparecen las células Vero/SLAM no infectadas; en los demás cuadros se presenta la aparición del efecto citopático (formación de sincicios de 1+ a 4+) después de la infección con el virus salvaje del sarampión



Las células Vero/SLAM también se pueden usar en el aislamiento viral de la rubéola a partir de muestras clínicas, con una sensibilidad análoga al aislamiento en células Vero corrientes. A diferencia del virus del sarampión, el virus de la rubéola de las muestras clínicas no produce efecto citopático en la gran mayoría de los casos, incluso después de varios pasajes. Sin embargo, la presencia del virus de la rubéola en el cultivo se puede detectar por otros métodos, en general, análisis de inmunofluorescencia o inmunocolorimétrico (figura 20). En este manual se describen ambos protocolos (Véanse apartados 9.4.15 y 9.4.16).

Figura 20. Resultados característicos de la detección del virus de la rubéola en cultivo celular usando dos inmunoensayos diferentes: un análisis por inmunofluorescencia (línea superior: cultivo infectado por el virus de la rubéola e infección simulada) y un análisis inmunocolorimétrico (línea inferior, cultivo infectado por el virus de la rubéola e infección simulada).



9.4.8 Exigencia de geneticina de las células Vero/SLAM

Dado el costo de la geneticina, varios laboratorios han investigado la necesidad de geneticina en la conservación de la expresión de la molécula activadora de la señalización del linfocito o SLAM en las células Vero/SLAM. Estos estudios sugirieron que la expresión de esta molécula es estable durante al menos 15 pases en medio de cultivo celular sin geneticina. Las

células siguen siendo plenamente susceptibles a la infección por virus salvajes del sarampión hasta después de 15 pases en medio de cultivo sin geneticina. Quince pases es la cantidad máxima de pases recomendados con cualquier línea celular usada para el aislamiento de virus. Con base en esta información, la OMS recomienda los siguientes procedimientos en la utilización de las células Vero/SLAM en los laboratorios de la red:

Preparación de cultivos de células patrones (“stock”) que se almacenan en nitrógeno líquido:

Los laboratorios de la red sólo deben aceptar células Vero/SLAM de una fuente aprobada por la OMS (laboratorio regional de referencia o laboratorio mundial especializado). Al recibirlas, las células se deben pasar a un medio que contenga 400 µg/ml de geneticina según se describe más adelante. En los laboratorios se deben efectuar pases de las células de 2 a 4 veces en medio con geneticina con el fin de preparar un número suficiente de frascos de cultivo que permitan el almacenamiento de 20 a 50 viales en nitrógeno líquido. Más adelante se presenta un procedimiento de criopreservación.

Pases de las células Vero/SLAM con fines de aislamiento sistemático del virus: Con el fin de preparar las células Vero/SLAM al aislamiento viral, se recuperan del nitrógeno líquido y se efectúan hasta 15 pases en medio sin geneticina. Estas células sólo se deben usar con fines de aislamiento viral y se deben desechar después de 15 pases. Las células que han tenido pases en medio sin geneticina nunca se deben usar en la preparación de cultivos patrones (“stock”) para almacenar en nitrógeno líquido ni se deben enviar a otro laboratorio de la red con fines de aislamiento de virus.

9.4.9 Materiales necesarios para el mantenimiento de las células Vero/SLAM

1. Medio DMEM:
con 4 500 mg/l de D-glucosa (con glucosa alta)
con L-glutamina
sin piruvato de sodio
Sustituto: EMEM
2. Antibióticos (100X)
10.000 unidades/ml de penicilina G y 10.000 µg/ml de sulfato de estreptomicina en solución salina al 0,85%
3. Tripsina-EDTA
Tripsina al 0,05% (páncreas porcino), con 0,53 mM EDTA en solución de Hanks sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺
4. Suero bovino fetal (definido)
5. Geneticina (G418), 50 mg/ml, se puede obtener en una solución líquida ya preparada.

9.4.10 Mantenimiento de las células Vero/SLAM

Cuando se efectúan los pases de células Vero/SLAM con fines de almacenamiento o de preparación de frascos o tubos para aislar virus se deben manipular en un gabinete de seguridad biológica “limpio”, completamente separado de los espacios donde se manipula todo material infeccioso e idealmente, en un laboratorio de cultivo celular específicamente diseñado.

1. Preparar el DMEM agregando los 5 ml de la solución de penicilina y estreptomicina a 500 ml de DMEM (DMEM-PS). Cuando se preparan cultivos patrones (“stock”) de

almacenamiento en nitrógeno líquido se añade geneticina a una concentración final de 400 µg/ml en DMEM (4 ml de una solución patrón a 50 mg/ml en 500 ml de DMEM) (DMEM-PSG).

2. Cuando las células Vero/SLAM son confluentes, se puede efectuar el pase por tripsinización del mismo modo que con toda línea celular adherente. Las células se mantienen generalmente en frascos de 25 cm² o 75 cm²; los volúmenes mencionados pueden luego ajustarse a frascos más grandes o más pequeños.
3. En frascos de cultivo celular de 25 cm² o 75 cm², lavar una vez el monoestrato de células con 5 ml de una solución de tripsina precalentada (o con solución salina amortiguada con fosfatos [PBS] tibia) durante 30 segundos a un minuto. Desechar el medio del lavado en una solución de hipoclorito. Agregar 5 ml de solución de tripsina precalentada y permitir una incubación de 4 a 5 minutos sobre la mesa de trabajo. Extraer la mayor parte de la tripsina dejando en el frasco solo una cantidad de líquido que mantenga húmedo el monoestrato (aproximadamente 1 ml). Colocar el frasco de cultivo a 37°C durante 3 a 4 minutos. Observar el frasco con intervalos de algunos minutos, a fin de verificar si las células se están desprendiendo. Cuando las células se estén desprendiendo, golpear rápidamente el frasco contra la palma de la mano a fin de desalojar las células restantes. Pipetear repetidamente con una pipeta de 1 ml o 2 ml a fin de disociar los agregados de células.
4. Resuspender las células en 5 ml de DMEM-PS o de DMEM-PSG con suero bovino fetal al 10% y pipetear repetidamente a fin de disociar los agregados. Sembrar las células en frascos que contengan DMEM-PS o DMEM-PSG con suero bovino fetal al 10%. Son aceptables proporciones de partición hasta de 1:5. Diluciones de 1:2 o de 1:3 suelen dar lugar a monoestratos con una densidad suficiente para el aislamiento viral después de 24 horas de incubación (volumen total de medio necesario: 10 ml en un frasco de 25 cm²; 30 ml en un frasco de 75 cm² y 50 ml en un frasco de 150 cm²).
5. Las células se deben pasar como mínimo una vez por semana; se pueden mantener durante varios días, cambiando el medio a uno que contenga suero bovino fetal al 2%, con el fin de prevenir un crecimiento excesivo.
6. No se deben efectuar más de 15 pasajes de las líneas celulares después de haberlas recuperado del nitrógeno líquido.

9.4.11 Infección de células Vero/SLAM para el aislamiento viral del sarampión

La preparación de las muestras destinadas al aislamiento viral, la inoculación de los virus y los pases posteriores de los virus en las células Vero/SLAM se deben llevar a cabo siempre en un gabinete de seguridad biológica, específicamente destinado a la manipulación de material infeccioso. El material potencialmente infeccioso se debe mantener completamente aislado de los espacios donde se manipulan los cultivos patrones ("stock") de células "limpias".

Para las inoculaciones, las células se siembran en frascos de cultivo celular de 25 cm² (T-25). Las células deben presentar una confluencia de 85% a 90% y llevar al menos un día después de su siembra. Cuando las células han crecido demasiado, el aislamiento viral será infructuoso. La inoculación del virus y su posterior incubación se deben hacer en DMEM-PS con suero bovino fetal al 2%.

1. Con el fin de infectar un cultivo de células en un frasco T-25, (equivale al primer pase del virus), decantar el medio de cultivo, agregar 5 ml de DMEM-PS con suero bovino fetal al

2% y 0,5 a 1 ml de la muestra. Incubar a 37°C durante 1 hora y observar las células en el microscopio a fin de verificar si la muestra fue tóxica para las células (redondeo de las células, células flotantes).

2. Las células infectadas se deben observar en microscopio óptico diariamente, en busca de efectos citopáticos. Practicar un pase de las células Vero/SLAM infectadas, por tripsinización después de 4 a 5 días (en un gabinete de seguridad biológica destinado específicamente a la manipulación de material potencialmente infeccioso), en una proporción de partición de 1:3 (pase número 2).
3. Verificar diariamente los frascos. Cuando no se observa ningún efecto citopático a los 4 o 5 días después del segundo pase, desechar el cultivo y registrar la prueba con un resultado negativo.
4. En caso de observar efecto citopático, continuar alimentando las células (reemplazar, si es necesario, el medio por DMEM-PS fresco con suero bovino fetal al 2%) hasta que el efecto citopático sea extenso. Puede ser necesario realizar un nuevo pase de las células, a fin de evitar un crecimiento excesivo y permitir que la infección se disemine. Cuando se observa efecto citopático al menos en 50 a 75% del monoestrato celular, se pueden recuperar células y preparar el “stock” de virus (véase etapa 5).
5. A fin de preparar un “stock” de virus, raspar las células hacia el medio con un raspador de células o una pipeta de 1 ml. Transferir el medio y las células a un tubo de centrifuga plástico estéril y centrifugar a alrededor de 1,000 x g durante 10 minutos. Desechar el sobrenadante en una solución de hipoclorito y resuspender el sedimento de células en 1,0 ml de DMEM-PS. Transferir 0,5 ml en cada uno de 2 crioviales y almacenar a -70°C. Otra posibilidad es desechar todo el medio sobrenadante en la solución de hipoclorito conservando solo 1 ml. Raspar las células hacia el medio restante, pipetear 0,5 ml en cada uno de 2 crioviales y almacenar a -70°C.
6. Cuando el aislamiento viral ha sido exitoso, se puede aplicar una prueba inmunológica como la inmunofluorescencia a fin de confirmar la presencia del virus del sarampión. Consultar el apartado 9.4.14. Preparar siempre un “stock” de virus para almacenamiento a largo plazo a -70°C.
7. No intentar efectuar pases del virus en líneas celulares diferentes de las células Vero/SLAM. Muchos aislados clínicos no se adaptan fácilmente al crecimiento en las células Vero ordinarias. El “stock” de virus se puede perder con un pase en una línea celular equivocada. El ARN destinado a los estudios de epidemiología molecular se debe preparar a partir de células Vero/SLAM infectadas.
8. Sólo se deben efectuar 15 pases de las líneas celulares después de recuperarlas de la crioconservación.
9. Incluir siempre un control negativo de células Vero/SLAM no infectadas durante los intentos de aislamiento viral. Se puede incluir un control positivo, pero el operador debe ser consciente de la posibilidad de contaminación cruzada. El control positivo dejará de ser necesario cuando el operador se familiarice bien con la apariencia del efecto citopático del sarampión en las células Vero/SLAM. Los controles positivos, cuando se usan, deben ser virus de tipo salvaje, caracterizados genéticamente.

Nota: En la actualidad, la OMS no recomienda las pruebas de susceptibilidad de las células Vero/SLAM. Sin embargo, cuando se realiza esta prueba, se debe usar una cepa de virus salvaje con pocos pases. Este virus debería producir un efecto citopático en las

células Vero/SLAM, mas no en las células Vero. Este resultado confirmaría que la apariencia del efecto citopático está relacionada con la expresión de SLAM.

9.4.12 Infección de células Vero/SLAM para el aislamiento viral de la rubéola

Se prefiere usar 35°C en el crecimiento del virus de la rubéola, pues es la temperatura óptima de algunas cepas del virus. Cuando no se cuenta con una incubadora a 35°C, una temperatura de 37°C constituye una alternativa aceptable.

Cuando se sospecha que una muestra contiene cantidades pequeñas de virus, se pueden efectuar pases con un lisado del cultivo de células infectadas, obtenido por congelación y descongelación (es decir, virus asociados a las células y virus en el medio de cultivo) como se describe a continuación, en lugar de utilizar sólo el medio de cultivo de las células infectadas.

1. Con el fin de realizar las inoculaciones, es preciso contar con un monoestrato de células que presente una confluencia del 85 al 90% en un frasco de cultivo celular de 25cm². Para inocular un frasco de 25 cm², (pase de virus número 1), decantar el medio de cultivo, agregar 2 ml de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) con suero bovino fetal al 1% y de 0,5 a 1 ml de muestra. Incubar a 35°C durante 1 hora. Después de 1 hora, extraer el inóculo y agregar 5 ml de DMEM-PS con suero bovino fetal al 5%.

Nota: Cuando ocurre contaminación, la muestra clínica se puede filtrar en una jeringa con filtro de baja retención de 0,2 µm, a fin de eliminar los hongos y las bacterias contaminantes. Otra posibilidad es agregar 0,1 ml de una solución con 1000 g/ml de gentamicina, 0,1 ml de una solución de 100 µg/ml de fungizona y 5 µl de una solución 1.000x de penicilina y estreptomycinina a 1 ml de la muestra clínica e incubar a 4°C durante 30 minutos antes de la inoculación.

2. Incubar las células durante 7 días a 35°C. Verificar las células diariamente y desechar en caso de percibir signos de contaminación (medio turbio, amarillo, muchas células flotantes u hongos). Lo más probable es que el efecto citopático de la rubéola (células redondeadas y algunas células flotantes) NO será visible.
3. En el séptimo día posinoculación, extraer 0,5 ml de medio. (Nota: a diferencia del virus del sarampión, los viriones del virus de la rubéola se liberan al medio y por lo tanto, se pueden utilizar los medios o las células de los cultivos infectados a fin de transferir el virus al siguiente pase). Transferir los 0,5 ml de medio a un nuevo frasco de 25 cm² que contiene células Vero/SLAM, como se hizo en la etapa de la inoculación (este es el pase número 2 del virus). Extraer además 1 ml de medio del primer pase y almacenarlo en un criovial a -70°C.
4. Después de 7 días de cultivo del pase número 2 del virus, extraer 100 µl de medio, con el fin de infectar un cultivo de células Vero/SLAM en un portaobjetos de cámara para realizar una inmunofluorescencia o una prueba inmunocolorimétrica o infectar un cultivo en un pozo de una placa 48 para una prueba inmunocolorimétrica. Almacenar 1 ml de medio del segundo pase en un criovial a -70°C.
5. Cuando el análisis por inmunofluorescencia o inmunocolorimetría es positivo, usar los medios congelados a partir del segundo pase con el fin de preparar el “stock” de virus. Preparar siempre un “stock” de virus cuando el aislamiento es exitoso. Descongelar la alícuota de medio almacenada y con 0,5 ml infectar un cultivo en un frasco T-75 como anteriormente (congelar de nuevo los 0,5 ml restantes como muestra de reserva. El medio conservado del primer pase constituye también una muestra de seguridad). Incubar el frasco de 75 cm² durante una semana a 35°C. Después de una semana, extraer de 5 a 10 ml de medio, distribuirlo en alícuotas y almacenarlas a -70°C. El ARN destinado a los

estudios de epidemiología molecular se debe preparar a partir de las células Vero/SLAM infectadas en el frasco de 75 cm². Cuando el análisis por inmunofluorescencia o inmunocolorimetría es negativo, registrar la muestra con un resultado negativo para rubéola.

Cuando se sospecha que una muestra contiene pequeñas cantidades de virus, se pueden efectuar pases con un lisado del cultivo de células infectadas, obtenido por congelación y descongelación (es decir, virus asociados a las células y virus en el medio de cultivo) como se describe a continuación, en lugar de utilizar sólo el medio de cultivo de las células infectadas.

9.4.13 Preparación de cultivos patrón (congelados) de células Vero/SLAM

Es extremadamente importante preparar múltiples viales congelados de células Vero/SLAM tan pronto estas lleguen al laboratorio. Se recomienda no efectuar más de 15 pases con las células. Estas células se pueden congelar usando cualquier técnica corriente de crioconservación. Existen medios comerciales de congelación; los reactivos y procedimientos descritos a continuación pueden ser adecuados.

1. Los pases de células Vero/SLAM se deben efectuar en DMEM-PSG (con geneticina) cuando se preparan cultivos patrón de células. Se necesita un cultivo en monoestrato de células Vero/SLAM en un frasco de 150 cm²; sin embargo, es posible usar frascos de 75 cm², ajustando los volúmenes según corresponda.
2. Antes de comenzar el protocolo, rotular un número suficiente de crioviales con cierre de rosca, con el nombre de las células, número del pase y la fecha.
3. Desprender las células del frasco por tripsinización como se describió anteriormente (evitar un exceso de tripsinización). Todas las células de un frasco de 150 cm² se deben suspender en 10 ml de DMEM-PS con suero bovino fetal al 10% y centrifugar a 1.500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Desechar el sobrenadante. Agregar al sedimento de células 5 ml de DMEM-PS (con antibióticos) y suero bovino fetal al 30% y resuspender las células en un agitador vorticial. Añadir un volumen igual (5 ml) de DMEM-PS (con antibióticos) y dimetil sulfóxido (DMSO) al 15% (grado de reactivo). Pipetear suavemente a fin de mezclar y distribuir 1 ml en cada uno de 10 crioviales plásticos. En este paso es importante trabajar muy rápidamente, pues la exposición prolongada al DMSO a temperatura ambiente será tóxica para las células. Los viales se deben enfriar lentamente usando un congelador de células programado o un dispositivo comercial destinado a la reducción gradual de la temperatura (en condiciones óptimas, 1°C por minuto entre -20°C y -70°C). Almacenar los viales en nitrógeno líquido.
4. Realizar un ensayo de recuperación de los cultivos patrón congelados antes de discontinuar el cultivo ordinario de las células Vero/SLAM de siembra (con geneticina en el medio). Recuperar las células de un vial empleando los procedimientos descritos en el apartado 5. Evaluar las células recuperadas; se deben observar células adherentes el primer día después de la recuperación. La formación de un monoestrato confluyente puede tomar varios días. Esto es normal. Cuando las células no se recuperan adecuadamente (por ejemplo, pocas o ninguna célula adherente o contaminación visible), será necesario preparar otro “stock” congelado a partir de los cultivos.
5. A fin de recuperar las células almacenadas en nitrógeno líquido, extraer el vial del congelador y trasladarlo al laboratorio en nieve carbónica. Descongelar las células rápidamente a baño maría a 37°C y colocarlas de inmediato en un frasco T-25 que contenga 10 ml de DMEM-PS con suero bovino fetal al 10%. Permitir que las células se

adhieran al frasco durante cerca de 4 horas. Una vez que las células se han adherido, decantar el medio y reemplazarlo con 10 ml de DMEM-PS con suero bovino fetal al 10%. Continuar observando las células y efectuando los pases por tripsinización después de que las células presentan confluencia. Nota: Cuando se recuperan células con el fin de preparar cultivos patrón suplementarios, se debe añadir genética al medio.

9.4.14 Confirmación de aislamiento viral del sarampión por inmunofluorescencia

En esta prueba de inmunofluorescencia se usa un anticuerpo monoclonal con el fin de detectar la nucleoproteína del virus del sarampión en las células infectadas. Las células infectadas se fijan a un portaobjetos. La unión del anticuerpo específico del sarampión se detecta usando un anticuerpo caprino antirratón que se conjuga con isotiocianato de fluoresceína (FITC). La unión del anticuerpo detector se visualiza en el microscopio de fluorescencia.

Diversos proveedores ofrecen kits comerciales de inmunofluorescencia directa e indirecta. En este manual se describirá la prueba de inmunofluorescencia indirecta de sarampión Light Diagnosis, de Chemicon, Inc (número de catálogo 3187).

También es posible configurar una prueba de inmunofluorescencia indirecta sin usar un kit comercial. La mayoría de los anticuerpos monoclonales contra la nucleoproteína (por ejemplo, el 80-2 KK2 de Chemicon) funcionará satisfactoriamente en el procedimiento descrito a continuación. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra otras proteínas virales como la hemaglutinina y las proteínas de fusión pueden reconocer los epítopes conformacionales que no son estables después de una fijación con acetona. Cuando se configura una prueba interna de inmunofluorescencia, las diluciones de trabajo apropiadas del anticuerpo monoclonal y del conjugado marcado con FITC se determinarán mediante titulación experimental.

Procedimiento de inmunofluorescencia Chemicon (modificado):

1. Desalojar las células de la superficie del frasco con un raspador de células. Colocar 1 ml de células desprendidas (es decir, 1/5 del volumen de células obtenidas de un frasco T-25) en un tubo de centrifuga y sedimentar por centrifugación a 1.500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Decantar el medio sobrenadante y resuspender las células en 0,25 ml de etanol frío al 50% en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS), mezclando en agitador vorticial. Extender unos 15 µl en un portaobjetos con cámara usando una micropipeta o una pipeta Pasteur y dejar secar las células al aire. No olvidar de incluir células no infectadas como control negativo.

Nota: Otro procedimiento posible de fijación es resuspender el sedimento de células (citado antes) en 0,1 ml de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) y agregar 10 a 20 µl por cámara (gota) en el portaobjetos. Dejar que la preparación se seque completamente al aire. Sumergir el portaobjetos en acetona helada al 80% durante 1 minuto, absorber cuidadosamente el exceso de líquido con papel filtro y secar al aire.

2. Preparar la solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) con polisorbato que contiene el kit (solución salina fosfatada, polisorbato 20 al 0,1%).
3. Cubrir las manchas de células en los portaobjetos con una gota (o 25 µl) del anticuerpo monoclonal del sarampión.
4. Incubar el portaobjetos a 37°C durante 30 minutos a 1 hora en una cámara húmeda. Con este fin, funcionan muy bien las placas de Petri que contienen una toalla de papel húmeda.

5. Lavar los portaobjetos durante 15 a 20 segundos en la solución salina con polisorbato y sacudir a fin de eliminar el exceso de líquido. Secar con una toalla de papel, teniendo cuidado de no tocar las células.
6. Cubrir las manchas de células con una gota (o 25 µl) de IgG antirratón conjugada con FITC.
7. Incubar el portaobjetos a 37°C durante 30 minutos en una cámara húmeda.
8. Lavar los portaobjetos durante 15 a 20 segundos en la solución salina con polisorbato y sacudirlos a fin de eliminar el exceso de líquido. Secar sobre una toalla de papel y preparar los portaobjetos a la observación añadiendo el medio de montaje y una laminilla cubreobjetos.
9. Examinar en microscopio de fluorescencia en busca de señal fluorescente. El FITC absorbe a 495 nm y tiene una emisión máxima a 525 nm. En estas condiciones, las células con tinción positiva mostrarán una fluorescencia granular verde en el citoplasma. La coloración de contraste azul de Evans se verá roja.

9.4.15 Prueba de inmunofluorescencia indirecta de detección del virus de la rubéola en cultivo celular

Esta es una prueba de inmunofluorescencia indirecta establecida por el laboratorio de rubéola de los CDC en Atlanta, usando un anticuerpo monoclonal específico dirigido contra la glicoproteína E1 del virus de la rubéola, obtenido en la misma institución. Los reactivos son muy importantes ya que el virus de la rubéola no produce grandes cantidades de antígeno. El protocolo de inmunofluorescencia del sarampión con fijación en acetona no da buen resultado con el virus de la rubéola, pues la señal de fondo de las células fijadas con acetona es superior a la señal de las proteínas del virus de la rubéola. El protocolo que se presenta continuación con fijación en paraformaldehído y un anticuerpo fluorescente con alta adsorción cruzada, sí da buenos resultados.

Equipo y reactivos necesarios:

- Incubadora de CO₂
- 8 portaobjetos con cámara
- Pipetas estériles
- Células Vero o Vero/SLAM
- Microscopio de fluorescencia con filtros apropiados
- Paraformaldehído al 2%*
- Suero bovino fetal
- Metanol
- DMEM, solución salina amortiguada con fosfatos (PBS)
- Antibióticos
- Yoduro de propidio** (almacenado a 4°C)
- Albúmina sérica bovina
- Polisorbato 20
- Medio de montaje para fluorescencia*** (almacenado a 4°C)
- Laminillas cubreobjetos

* El paraformaldehído se puede adquirir en forma de solución primaria al 16% (por ejemplo, en *Electron Microscopy Sciences*, número de catálogo 15710). Diluir en proporción de 1:8 con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) fría, inmediatamente antes de usarlo.

- ** por ejemplo, de *Molecular Probes*, número de catálogo P-3566. Diluir en proporción de 1:2000 en solución bloqueadora.
- *** por ejemplo, medio de montaje para fluorescencia de Dako, número de catálogo S3023.

Anticuerpos: El conjugado de anticuerpos caprinos antirrátón de tipo IgG (Alexa Fluor ® 488 de *Molecular Probes*, Eugene, Or, EUA, sitio web: <http://www.probes.com>) (conservar a 4°C). Anticuerpo monoclonal (contra la glicoproteína E1 del virus de la rubéola) del laboratorio de rubéola de los CDC (almacenar a -20°C).

Crecimiento de células Vero o Vero/SLAM e infección por el virus:

Se prefiere usar 35°C en el crecimiento del virus de la rubéola, pues es la temperatura óptima de algunas cepas del virus. Cuando no se cuenta con una incubadora a 35°C, una temperatura de 37°C constituye una alternativa aceptable.

1. Dejar crecer las células Vero o Vero/SLAM hasta cuando presenten una confluencia del 50% en un portaobjetos con 8 cámaras, por ejemplo, el de Lab-Tek (número de catálogo 177445). No permitir un crecimiento excesivo de las células. Normalmente esto se consigue usando el medio DMEM con suero bovino fetal al 5% con penicilina y estreptomina en una incubadora de CO₂ a 35°C.

Nota: Cuando no se cuenta con una incubadora de CO₂, tendrá que sellarse la cámara del portaobjetos, a fin de permitir el crecimiento de las células y del virus después de la inoculación (véase apartado 2 más adelante). El cierre de la cámara debe ser impermeable a los gases, lo cual se obtiene recubriendo por ejemplo los **bordes** de la cámara del portaobjetos con vaselina filante.

2. Extraer el medio y agregar a una cámara 100 µl de la muestra (medio del segundo pase del cultivo de una muestra clínica sembrada en células Vero o Vero/SLAM).
3. Se debe añadir una muestra positiva conocida (como una cepa de tipo salvaje bien caracterizada) a una cámara en un extremo del portaobjetos. El control positivo se debe rodear de tres cámaras con controles negativos (agregar solo medio) a fin de disminuir la posibilidad de que el control positivo contamine una cámara que contiene muestra. Cuando se utiliza como control una solución con un título alto de virus, esta se debe diluir previamente. Incubar 1 hora a 35°C, en incubadora de CO₂, a fin de permitir la fijación del virus.
4. Agregar 200 µl de DMEM con suero bovino fetal al 5%. Incubar durante 3 días a 35°C en incubadora de CO₂ (a 37°C). Al final de una incubación de 3 días, los resultados de la inmunofluorescencia serán óptimos si el monoestrato de células presenta una confluencia cercana al 80%, pero un monoestrato totalmente confluyente es aceptable.
5. Cuando el medio de cultivo en los pozos que contienen virus se vuelve ácido (amarillo), esta puede ser una indicación de la presencia del virus.

Fijación de las células:

Fijar las células usando paraformaldehído al 2% en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS), la cual se ha enfriado a 4°C. Permeabilizarlas luego con metanol a -20°C.

1. Sacar el portaobjetos de cámaras de la incubadora y colocarlo sobre hielo durante 10 minutos; mantener el portaobjetos por encima del hielo colocándolo sobre una tira de papel de aluminio en contacto con el hielo.

2. En un gabinete de seguridad biológica, extraer el medio de cultivo y lavar una vez con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) fría. Al remover el medio, insertar la punta de la pipeta en una esquina de la cámara y usar la misma esquina durante todo el procedimiento a fin de reducir al mínimo la pérdida de células. Por la misma razón, agregar los reactivos deslizándolos sobre el la pared de la cámara.
3. Agregar 200 µl de paraformaldehído al 2% y dejar durante 30 minutos sobre hielo.
4. Extraer el paraformaldehído y lavar una vez con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) fría. El resto del procedimiento se puede llevar a cabo sobre la mesa de trabajo, pues el paraformaldehído ha inactivado el virus.
5. Agregar 200 µl de metanol a -20°C e incubar durante 10 minutos a -20°C. Se consigue sin dificultad colocando el portaobjetos en un congelador a -20°C, en caso de no tenerlo, se puede colocar el portaobjetos sobre un bloque refrigerante congelado (a -20°C) (por ejemplo, el *Frigid Brick* elaborado por *Touchpad Solutions*) en la mesa de trabajo del laboratorio.
6. Extraer el metanol y lavar una vez con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) a temperatura ambiente.
7. Las células fijadas se pueden almacenar en este punto, cubiertas con solución bloqueadora (albúmina sérica bovina al 1%, suero bovino fetal al 0,5%, polisorbato 20 al 0,1% en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS)). Llenar las cámaras o los pozos con solución bloqueadora; las células fijadas cubiertas con solución bloqueadora se pueden almacenar en una cámara húmeda a 4°C por lo menos durante un mes. Con fines de almacenamiento a largo plazo, agregar a la solución bloqueadora una solución 1X de penicilina y estreptomycinina.

Nota: El dispositivo de cámara húmeda se obtiene en forma sencilla colocando el portaobjetos sobre toallas de papel húmedas en una caja plástica o envolviéndolo en plástico fino de envoltura.

Procedimiento de la inmunofluorescencia:

El bloqueo, las diluciones de anticuerpos y de yoduro propidio y los lavados se realizan todos en solución bloqueadora a temperatura ambiente. En los lavados finales después del yoduro propidio se usa solo solución salina amortiguada con fosfatos (PBS).

1. Bloquear las reacciones inespecíficas de los anticuerpos agregando 200 µl de solución bloqueadora en cada cámara durante 1 hora a temperatura ambiente (este paso se puede omitir cuando se ha almacenado el portaobjetos en el solución bloqueadora.).
2. Eliminar la solución bloqueadora y agregar el anticuerpo monoclonal diluido (100 µl por pozo) en solución bloqueadora. Incubar una hora a temperatura ambiente. Diluir la solución primaria de anticuerpo monoclonal en una proporción de 1:1000 para el análisis (para el lote número 03-031). Nótese que la dilución del anticuerpo monoclonal puede diferir según el lote utilizado.
3. Lavar 2 veces con solución bloqueadora y agregar luego el segundo anticuerpo fluorescente a la solución bloqueadora (100 µl por pozo). Normalmente este anticuerpo es el anticuerpo caprino antirrátón de tipo IgG 488 de Alexa Fluor (H+L) “con alta adsorción cruzada” en una dilución de 1:500. Incubar 30 minutos a temperatura

ambiente; cubrir el portaobjetos con papel de aluminio con el fin de mantenerlo en la oscuridad.

4. Lavar 2 veces con solución bloqueadora y agregar luego el yoduro propidio a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ en solución bloqueadora. Incubar el portaobjetos cubierto con papel de aluminio de 5 a 15 minutos a temperatura ambiente.
5. Lavar 2 veces con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS). Despegar las cámaras y la junta del portaobjetos.
Drenar el exceso de solución salina fosfatada con papel absorbente o papel filtro. Dejar secar el portaobjetos completamente y agregar luego 2 a 3 gotas de medio de montaje (por ejemplo, Dako). Colocar cuidadosamente la laminilla cubreobjetos y hacer una leve presión a fin de eliminar las burbujas. Limpiar el exceso de medio de los bordes con papel absorbente.
6. Observar los resultados en microscopio de fluorescencia, empleando luz azul (por ejemplo, el filtro 485 de Zeiss Axiovert BlueH).

Nota: Las células infectadas por el virus de la rubéola serán verdes; los núcleos teñidos con yoduro de propidio serán rojos. No se debe observar ningún fondo de tinción verde del anticuerpo en las células no infectadas (cámaras con control negativo), aunque en ocasiones se observa alguna tinción cerca de los bordes de las cámaras, probablemente debida a la junta. Cuando se observa señal de fondo del anticuerpo, muy probablemente se debe a un exceso del segundo anticuerpo fluorescente. La utilidad de la prueba de inmunofluorescencia depende de una baja señal de fondo de la tinción con el anticuerpo en las células no infectadas. Según la cantidad de virus presente en el inóculo, es posible que no todas las células exhiban una fluorescencia verde (de hecho, con las muestras clínicas es posible que solo un número muy reducido de células presenten fluorescencia, por ejemplo, 2 focos con 10 células cada uno en toda la capa de crecimiento celular).

9.4.16 Prueba inmunocolorimétrica de detección de virus de la rubéola en cultivo celular

Este es un análisis colorimétrico indirecto que utiliza un anticuerpo monoclonal específico dirigido contra la glucoproteína E1 del virus de la rubéola, desarrollado por el laboratorio de rubéola de los CDC en Atlanta. El procedimiento es casi equivalente a la prueba de inmunofluorescencia de la rubéola, hasta la etapa de adición del anticuerpo secundario, que en este caso está conjugado a la peroxidasa en lugar de ser fluorescente. En la prueba inmunocolorimétrica se utiliza el doble de la cantidad de anticuerpo monoclonal. La descripción de esta prueba se aplica a los portaobjetos con cámaras y a las placas de 48 pozos. Cuando se utiliza la placa de 48 pozos en lugar del portaobjetos existe una diferencia en el procesamiento de los controles positivos.

Equipo y reactivos necesarios:

- Incubadora de CO_2
- 8 portaobjetos con cámaras o placas de cultivo celular de 48 pozos
- Pipetas estériles
- Células Vero o Vero/SLAM
- Paraformaldehído al 2% *
- Suero bovino fetal
- Metanol
- DMEM, solución salina amortiguada con fosfatos (PBS)
- Antibióticos

- Albúmina sérica bovina
- Polisorbato 20
- Sustrato BM Blue de Roche de la peroxidasa, para pruebas de precipitación: número de catálogo 1442066, 100 ml; \$112,00

* El paraformaldehído se puede adquirir en forma de solución primaria al 16% (por ejemplo, en *Electron Microscopy Sciences*, número de catálogo 15710). Diluir en una proporción de 1:8 con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) fría, inmediatamente antes de usarlo.

Anticuerpos: Anticuerpo caprino antirratón, HRP conjugado

Molecular Probes: número de catálogo G21040; \$122,00.

Anticuerpo monoclonal (contra la glucoproteína E1 del virus de la rubéola) del laboratorio de rubéola de los CDC (almacenado a -20 °C)

Crecimiento de células Vero o Vero/SLAM e infección por el virus:

En los siguientes protocolos se realiza el crecimiento del virus de la rubéola a 35°C, pues algunas cepas del virus crecen mejor a esta temperatura. Cuando no se cuenta con una incubadora a 35°C, una temperatura de 37°C es una alternativa aceptable.

1. Dejar crecer las células Vero o Vero/SLAM hasta cuando presenten una confluencia del 75% en un portaobjetos de 8 cámaras, por ejemplo, el de Lab-Tek (número de catálogo 177445) o en los pozos de una placa de cultivo de 48 pozos. No permitir un crecimiento excesivo de las células. Normalmente esto se consigue usando medio DMEM con suero bovino fetal al 5% con penicilina y estreptomycinina en una incubadora de CO₂ a 35°C.

Nota: Cuando no se cuenta con una incubadora de CO₂, se sellará la placa o la cámara del portaobjetos, a fin de permitir el crecimiento de las células y del virus después de la inoculación (véase apartado 2 más adelante). El cierre debe ser impermeable a los gases, lo cual se obtiene recubriendo por ejemplo los bordes de la cámara del portaobjetos o los bordes de la tapa de la placa de 48 pozos con vaselina filante.

2. Extraer el medio y agregar a una cámara o a un pozo 100 µl de la muestra (medio del segundo pase del cultivo de una muestra clínica sembrada en células Vero o Vero/SLAM).
3. Se debe añadir una muestra positiva conocida (como una cepa de tipo salvaje bien caracterizada) a una cámara de un extremo del portaobjetos. El control positivo se debe rodear de tres cámaras con controles negativos (agregar solo medio) a fin de disminuir la posibilidad de contaminación de la cámara de la muestra, con el control positivo. Cuando se utiliza como control una solución con un título alto de virus, esta se debe diluir previamente. Incubar 1 hora a 35°C, en incubadora de CO₂, a fin de permitir la fijación del virus.
4. Agregar 200 µl de DMEM con suero bovino fetal al 5%. Incubar durante 5 días a 35°C en incubadora de CO₂ (a 37°C). Al final de una incubación de 5 días, los resultados de la inmunofluorescencia serán óptimos si el monoestrato de células presenta una confluencia cercana al 80%, pero un monoestrato totalmente confluyente es aceptable.
5. Cuando el medio de cultivo en los pozos que contienen virus se vuelve ácido (amarillo), esta puede ser una indicación de la presencia del virus.

Nota: Los controles positivos que se utilizarán en las placas de 48 pozos se deben preparar con antelación y almacenar hasta el momento de usarlos en el estudio de las muestras

según se describe más adelante. La preparación independiente de los testigos positivos reduce considerablemente la posibilidad de contaminación de las muestras con los mismos. Se debe preparar una muestra positiva conocida (como una cepa vacunal o una cepa de laboratorio) en otra placa de 48 pozos. Cuando se usa una solución con una cepa de virus de laboratorio con un título alto, esta se debe diluir antes de añadirla a las células, en una proporción de 1:10 a 1:1000 en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) con suero bovino fetal al 1%. Se pueden sembrar varios pozos de la placa de 48 con el testigo positivo del virus. Después del paso de fijación de las células (véase luego) las placas se pueden almacenar a 4°C durante **al menos** 1 mes, a condición de cubrir los pozos con solución bloqueadora. Extraer la solución bloqueadora de un pozo fijo, el cual será el control positivo y completar el análisis colorimétrico, comenzando con la etapa de adición del anticuerpo monoclonal. La placa se puede entonces conservar en el frigorífico hasta el siguiente análisis.

Fijación de las células:

Fijar las células usando paraformaldehído al 2% en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS), la cual se ha enfriado a 4°C. Permeabilizarlas luego con metanol a -20°C.

1. Sacar el portaobjetos de cámaras o la placa de cultivo de la incubadora y colocarlo sobre hielo durante 10 minutos; colocarlos sobre una tira de papel de aluminio en contacto con el hielo.
2. En un gabinete de seguridad biológica, extraer el medio de cultivo y lavar una vez con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) fría. Al remover medio, insertar la punta de la pipeta en una esquina de la cámara (o una posición en el pozo) y usar la misma esquina o la misma posición durante todo el procedimiento a fin de reducir al mínimo la pérdida de células. Por la misma razón, agregar los reactivos deslizándolos sobre la pared de la cámara o del pozo.
3. Agregar 200 µl de paraformaldehído al 2% y dejar durante 30 minutos sobre hielo.
4. Extraer el paraformaldehído y lavar una vez con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) fría. El resto del procedimiento se puede llevar a cabo sobre la mesa de trabajo, pues el paraformaldehído ha inactivado el virus.
5. Agregar 200 µl de metanol a -20°C e incubar durante 10 minutos a -20°C. Se consigue sin dificultad colocando el portaobjetos o la placa en un congelador a -20°C, en caso de no tenerlo, se puede colocar el portaobjetos o la placa sobre un bloque refrigerante congelado (a -20°C) sobre la mesa de trabajo del laboratorio.
6. Extraer el metanol y lavar una vez con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) a temperatura ambiente.
7. Las células fijadas se pueden almacenar en este punto, cubiertas con solución bloqueadora (albúmina sérica bovina al 1%, suero bovino fetal al 0,5% y polisorbato 20 al 0,1% en solución salina amortiguada con fosfatos [PBS]). Llenar las cámaras o los pozos con solución bloqueadora; las células fijadas cubiertas con solución bloqueadora se pueden almacenar en una cámara húmeda a 4°C por lo menos durante un mes. Con fines de almacenamiento a largo plazo, agregar a la solución bloqueadora una solución 1X de penicilina y estreptomicina.

Nota: El dispositivo de cámara húmeda se obtiene en forma sencilla colocando el portaobjetos o la placa sobre toallas de papel húmedas en una caja plástica o envolviéndolo en plástico fino de envoltura.

Procedimiento colorimétrico:

El bloqueo y las diluciones de anticuerpos se realizan en solución bloqueadora (albúmina sérica bovina al 1%, suero bovino fetal al 0,5% y polisorbato 20 al 0,1% en solución salina amortiguada con fosfatos [PBS]) a temperatura ambiente.

1. Bloquear las reacciones inespecíficas de los anticuerpos, agregando 200 μ l de solución bloqueadora en cada cámara o pozo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Este paso se puede omitir cuando se ha conservado el portaobjetos en la solución bloqueadora.
2. Diluir el anticuerpo monoclonal contra la rubéola en una proporción de 1:500 (con el lote número 03-031) en solución bloqueadora. (Esta es dos veces la cantidad de anticuerpo monoclonal usado en el protocolo de inmunofluorescencia). Extraer la solución bloqueadora de las cámaras o los pozos y agregar 100 μ l del anticuerpo monoclonal diluido en cada cámara o pozo. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Lavar dos veces las cámaras o los pozos con solución bloqueadora (cerca de 0,5 ml cada vez).
4. Diluir el anticuerpo caprino antirratón conjugado con peroxidasa en una proporción de 1:1.000 en solución bloqueadora. Agregar 100 μ l por cámara o pozo a temperatura ambiente durante 30 minutos.
5. Lavar dos veces las cámaras con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) (cerca de 0,5ml cada vez).
6. Agregar a cada cámara 50 μ l de sustrato BM Blue de peroxidasa y a cada pozo en la placa de 48 agregar 100 μ l. El color debe ser visible en 2 minutos. El color será más oscuro con una incubación más prolongada y en la cámara o el pozo con simulación infección el color deberá ser considerablemente menos oscuro que el del control positivo. Cuando la infección es diseminada, el resultado debe ser visible al ojo desnudo. Cuando sólo están infectadas unas pocas células, el resultado puede no ser visible y las cámaras que parecen negativas se deben examinar en un microscopio de luz. La tinción se percibirá como puntos. Nota: Cuando se usan portaobjetos con cámaras, no es necesario retirar estas del portaobjetos. No se precisa laminilla cubreobjetos. A fin de almacenar las células, extraer el sustrato y agregar 200 μ l de solución estabilizadora del color (Tris 50 mM; pH 6,8; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM) a temperatura ambiente durante 5 minutos. Extraer la solución estabilizadora. En este momento, las células teñidas se pueden almacenar en la oscuridad sin que haya pérdida de color. Es posible que no todas las células exhiban la tinción, dependiendo de la cantidad de virus presente en el inóculo. De hecho, con las muestras clínicas es posible que solo un número muy reducido de células presenten tinción.

Nota: Los anticuerpos monoclonales se deben almacenar a -20°C . El conjugado de peroxidasa diluido según las instrucciones del fabricante se almacena a -20°C y el BM Blue se puede almacenar a 4°C .

9.5 Embalaje de muestras y aislados clínicos (Reemplazar con el apartado 9.5 ACTUALIZADO)

Tomado de: “Transporte de sustancias infecciosas. Información general sobre las enmiendas a la 13.^a revisión de la Reglamentación Modelo de las Naciones Unidas en lo relativo al transporte de sustancias infecciosas” OMS/CDS/CSR/LYO/2004.9

9.5.1 Instrucción de embalaje P650. Esta instrucción de embalaje se aplica a las muestras de diagnóstico (UN 3373)

El embalaje será de buena calidad, suficientemente robusto como para resistir los choques y las cargas que tienen lugar normalmente durante el transporte, incluido el trasbordo entre las diferentes unidades de transporte y entre las unidades de transporte y los almacenes, así como izados de palés o el sobreembalaje a fines manipulación posterior manual o mecánica. Los embalajes se construirán y cerrarán de tal forma que no se produzca ninguna pérdida del contenido que podría causar la vibración, los cambios de temperatura, la humedad o la presión en las condiciones normales del transporte.

El embalaje constará de tres componentes:

- un recipiente primario,
- un envase secundario y
- un embalaje exterior.

Los recipientes primarios se colocarán en envases secundarios de tal manera que, en las condiciones normales del transporte, no se puedan romper, perforar ni dejen escapar su contenido al envase secundario. Los envases secundarios irán asegurados a los embalajes exteriores con material de relleno suficiente. Ninguna fuga del contenido comprometerá la integridad del material de relleno ni del embalaje exterior.

Durante el transporte, la marca que se muestra a continuación deberá figurar sobre la superficie externa del embalaje exterior, sobre un fondo de color que contraste con ella y deberá ser claramente visible y legible. El ancho de la línea será como mínimo de 2 mm; las letras y los números tendrán al menos 6 mm de altura.



El embalaje compuesto será capaz de superar la prueba de caída del 6.3.2.5 según se especifica en los apartados 6.3.2.3 y 6.3.2.4 de la presente Reglamentación, con la salvedad de que la altura de la prueba de caída no será inferior a 1,2 m.

Para las sustancias líquidas:

- El recipiente o recipientes primarios deberán ser impermeables.
- El envase secundario deberá ser impermeable.
- Cuando se colocan múltiples recipientes primarios frágiles en un envase secundario único, los recipientes primarios irán envueltos individualmente o estarán separados de manera que se evite todo contacto entre ellos.
- Se colocará un material absorbente entre el recipiente o recipientes primarios y el envase secundario. El material absorbente estará en cantidad suficiente de manera que pueda contener la totalidad del contenido del recipiente primario, a fin de que el escape de una sustancia líquida no altere la integridad del material de relleno ni del embalaje exterior.
- El recipiente primario o el envase secundario deberán resistir sin fugas, una presión interna de 95 kPa (0,95 baros).

Muestras refrigeradas o congeladas: hielo, nieve carbónica y nitrógeno líquido

- Cuando se usa nieve carbónica o nitrógeno líquido con el fin de mantener frías las muestras, habrán de cumplirse todos los requisitos aplicables de este reglamento. Cuando se usen, el hielo o la nieve carbónica se colocarán fuera de los envases secundarios o en el embalaje externo o en un sobreembalaje. Se proveerán soportes internos a fin de que los envases secundarios conserven su posición original una vez que se haya fundido el hielo o evaporado la nieve carbónica. Cuando se utiliza hielo, el embalaje externo o sobreembalaje habrá de ser impermeable. Cuando se utiliza dióxido de carbono sólido (nieve carbónica), el embalaje se diseñará y construirá de manera que permita la salida del dióxido de carbono, previniendo así una acumulación de presión que podría romper los embalajes, y se marcará "Dióxido de carbono sólido" o "Nieve carbónica".
- El recipiente primario y el envase secundario deberán mantener su integridad a la temperatura del refrigerante utilizado y a las temperaturas y presiones que pudieran producirse en caso de pérdida de la refrigeración.

Las sustancias infecciosas adscritas al N° 3373 ONU que se embalen y marquen en conformidad con esta instrucción no estarán sujetas a ninguna otra prescripción del presente reglamento.

Los fabricantes de tales embalajes y los distribuidores ulteriores deberán suministrar, al remitente o a la persona que prepara el embalaje (por ejemplo, un paciente), instrucciones claras sobre su llenado y cierre a fin de que pueda prepararlo correctamente para el transporte.

9.5.2 Instrucción de embalaje P620. Esta instrucción de embalaje se aplica a los cultivos y a los aislados virales (UN No. 2814 y 2900)

Se autorizan los siguientes embalajes siempre que se respeten las disposiciones especiales de embalaje del capítulo 4:

Embalajes que reúnan los requisitos del apartado 6.3 y hayan sido aprobados en consecuencia, y que constan de empaques interiores que comprendan:

- recipiente o recipientes primarios impermeables;
- un envase secundario impermeable; y
- salvo en el caso de las sustancias infecciosas sólidas, un material absorbente colocado entre el recipiente o recipientes primarios y el envase secundario, en cantidad suficiente que absorba la totalidad del contenido; cuando se colocan varios recipientes

primarios frágiles en un envase secundario único, irán envueltos individualmente o estarán separados de manera que se evite todo contacto entre ellos.

Un embalaje exterior rígido con una resistencia proporcional a su capacidad, peso y uso previsto. La dimensión exterior mínima no será inferior a 100 mm.

Requisitos adicionales:

Los embalajes interiores que contengan sustancias infecciosas no se agruparán con embalajes interiores que contengan mercancías que no sean afines. Los embalajes compuestos se podrán disponer en un sobreembalaje en conformidad con las disposiciones 1.2.1 y 5.1.2; tal sobreembalaje podrá contener nieve carbónica.

Cuando no se trate de envíos excepcionales como órganos enteros que requieran un embalaje especial, se aplicarán las siguientes disposiciones adicionales:

- Sustancias expedidas a temperatura ambiente o a una temperatura superior: los recipientes primarios serán de vidrio, metal o plástico. Con el fin de procurar la impermeabilidad se utilizarán medios eficaces de cierre como termosoldaduras, tapones de faldón o cápsulas metálicas que se pliegan sobre el recipiente. Cuando se usen cierres de rosca, estos se reforzarán con medios eficaces tales como las bandas, cintas adhesivas de parafina o cierres de fijación fabricados con tal fin.
- Sustancias expedidas refrigeradas o congeladas: se colocará hielo, nieve carbónica u otro producto refrigerante alrededor del envase o de los envases secundarios o, en el interior de un sobreembalaje que contenga uno o varios embalajes compuestos marcados según lo prescrito en el apartado 6.3. Se proveerán soportes interiores a fin de que el envase o envases secundarios conserven su posición original una vez que se haya fundido el hielo o evaporado la nieve carbónica. Cuando se utiliza hielo, el embalaje externo o sobreembalaje habrá de ser impermeable. Cuando se utiliza nieve carbónica, el embalaje se diseñará y construirá de manera que permita la salida del dióxido de carbono. El recipiente primario y el envase secundario mantendrán su integridad a la temperatura del refrigerante utilizado.
- Sustancias expedidas el nitrógeno líquido: se utilizarán recipientes primarios de plástico capaces de resistir temperaturas muy bajas. El envase secundario también tendrá que soportar temperaturas muy bajas, y en la mayoría de los casos tendrá que ajustarse individualmente sobre el recipiente primario. Se cumplirán asimismo las disposiciones relativas al transporte del nitrógeno líquido. El recipiente primario y el envase secundario habrán de conservar su integridad a la temperatura del nitrógeno líquido.
- Las sustancias liofilizadas también se podrán transportar en recipientes primarios que consistan en ampollas de vidrio termoselladas o viales de vidrio con tapones de goma natural provistos de un precinto metálico.

Sea cual fuere la temperatura prevista para el transporte, el recipiente primario o el envase secundario tendrán que ser capaces de resistir, sin que se produzcan fugas, una pérdida de presión interna que genere una diferencia de presión de no menos de 95 kPa y temperaturas entre -40°C y 55°C.

9.6 Composición de los medios y reactivos

Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS), pH 7,2 (PBS)

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
NaHPO ₄	1,15 g
KHPO ₄	0,20 g

- Disolver los reactivos en agua destilada. Obtener un volumen final de 800 ml.
- Ajustar el pH a 7,2 con HCl.
- Esterilizar en autoclave a 10 psi durante 15 minutos. Así se obtiene una solución de trabajo de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) sin calcio ni iones de magnesio.
- (La solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) se encuentra también comercializada en presentación en polvo, comprimidos o líquido)

Solución de lavado de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) y polisorbato

Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS)
Polisorbato 20 (comercial)

- Agregar 0,05 ml de polisorbato 20 por 100 ml de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS). Preparar el volumen suficiente para una prueba.

Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS), gelatina y polisorbato

solución salina amortiguada con fosfatos (PBS)	1 litro
Polisorbato 20	1,5 ml
Gelatina	5,0 g

- Mezclar 5,0 g de gelatina en 1 litro solución salina amortiguada con fosfatos (PBS).
- Calentar a fin de disolver la gelatina y agregar 1,5 ml de polisorbato 20.
- Almacenar a 4°C.

Medio de transporte de virus

Solución salina de Hanks 10x (Gibco/Invitron)	100 ml
Agua desionizada estéril	900 ml
Albúmina bovina estéril al 20%	10 ml
Solución estéril de estreptomicina y penicilina	10 ml
Bicarbonato de sodio estéril al 4,4% hasta pH 6,7	

- Agregar asépticamente al agua desionizada la solución salina de Hanks 10x, la albúmina bovina al 20% y la solución de estreptomicina y penicilina y mezclar bien.
- Ajustar exactamente el pH a 7,4, en forma aseptica, con la solución de bicarbonato de sodio, mezclando bien después de cada adición.
- Distribuir asepticamente alícuotas de 2 ml en botellas o frascos estériles de 25 ml con cierre de rosca. Cerrar firmemente las tapas.

- Almacenar a 4°C. El tiempo de conservación a 4°C es de 6 meses.

Solución de estreptomicina y penicilina

- Disolver 1×10^6 unidades de penicilina y 1 g de sulfato de estreptomicina en 100 ml de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) estéril. Almacenar en alícuotas de 5 ml a -20°C.

Un mililitro de esta solución en 100 ml de medio de cultivo da una concentración final de 100 unidades de penicilina y 100 mg de estreptomicina por mililitro.

10. Lectura complementaria sugerida

(revisada en febrero de 2007)

10.1 Impacto mundial del sarampión y la rubéola

- Wolfson, L.J., P.M. Strebel, M. Gacic-Dobo et al. Has the 2005 measles mortality reduction goal been achieved? A natural history modelling study. *Lancet* 2007. 369: p 191-200.
- World Health Organization. Progress in reducing global measles deaths: 1999-2004. *Wkly Epidemiol Rec*, 2006. 81; p 89-96. Consultable en internet en: <http://www.who.int/wer/2006/wer8110.pdf>
- Centers for Disease Control and Prevention. *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases "The Pink Book" 10th Edition (February 2007)*. Consultable en internet en: <http://www.cdc.gov/nip/publications/pink/default.htm>
- Papania, M., M. Wharton and S. Redd. Chapter 6: Measles. In: *Manual for the Surveillance of Vaccine-Preventable Diseases 3rd edition 2002*. Consultable en internet en: http://www.cdc.gov/nip/publications/surv-manual/chpt06_measles.pdf
- Griffin, D.E. Measles virus. In: Knipe, D.M. and P.M. Howley (eds) *Fields Virology, 4th ed.*, Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 2001. p 1401-1441.
- Robertson, S.E., D.A. Featherstone, M. Gacic-Dobo and B.S. Hersh. Rubella and congenital rubella syndrome: global update. *Rev Panam Salud Publica* 2003. 14(5): p 306-15.
- Zimmerman, L. and S. Reef. Chapter 11: Rubella. In: *Manual for the Surveillance of Vaccine-Preventable Diseases 3rd edition 2002*. Consultable en internet en: http://www.cdc.gov/nip/publications/surv-manual/chpt11_rubella.pdf
- Chantler, J., J.S. Wolinsky and A. Tingle. Rubella Virus. In: Knipe, D.M and P.M. Howley (eds): *Fields Virology, 4th ed.*, Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 2001. p 963-990.
- Moss, W.J. and D.E. Griffin. Global measles elimination. *Nat Rev Microbiol* 2006. 4 (12): p 900-908.
- Orenstein, W.A. The Role of Measles Elimination in Development of a National Immunization Program. *Pediatr Infect Dis* 2006. 25 (12): p 1093-1101.

10.2 Estrategias de control

- World Health Organization and UNICEF. GIVS Global Immunization Vision and Strategy 2006-2015. Geneva 2005, WHO/IVB/05.05. Consultable en internet en: http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF05/GIVS_Final_EN.pdf
- World Health Organization. WHO-UNICEF joint statement on strategies to reduce measles mortality worldwide. *Wkly Epidemiol Rec* 2002. 77: p 224-28 Consultable en internet en: <http://www.who.int/docstore/wer/pdf/2002/wer7727.pdf>
- World Health Organization. Measles mortality reduction and regional elimination. Strategic plan 2001-2005. WHO/V&B/01.13 Rev. 1 (2003). Consultable en internet en: <http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF01/www573.pdf>

- World Health Organization Regional Office for Europe. Strategic plan for measles and congenital rubella infection in the European Region of WHO 2003. Consultable en internet en: <http://www.euro.who.int/document/e81567.pdf>
- Cutts, F.T., SE. Robertson, J-L. Diaz-Ortega, and R. Samuel. Control of rubella and congenital rubella syndrome (CRS) in developing countries, part 1:burden of disease from CRS. Bulletin of the World Health Organization, 1997. 75 (1): p 55-68 . Consultable en internet en: [http://whqlibdoc.who.int/bulletin/1997/Vol75-No1/bulletin_1997_75\(1\)_55-68.pdf](http://whqlibdoc.who.int/bulletin/1997/Vol75-No1/bulletin_1997_75(1)_55-68.pdf)
- Robertson, S.E., F.T. Cutts, R. Samuel, and J.-L. Diaz-Ortega. Control of rubella and congenital rubella syndrome (CRS) in developing countries, part 2: vaccination against rubella. Bull World Health Organization, 1997. 75 (1): p 69-80. Consultable en internet en: [http://whqlibdoc.who.int/bulletin/1997/Vol75-No1/bulletin_1997_75\(1\)_69-80.pdf](http://whqlibdoc.who.int/bulletin/1997/Vol75-No1/bulletin_1997_75(1)_69-80.pdf)
- World Health Organization. Control of rubella and congenital rubella syndrome (CRS) in developing countries. Geneva, 2000. WHO/V&B/00.03; se puede obtener de Immunization, Vaccines and Biologicals, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland. Consultable en internet en: <http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF/ww9656a.pdf>
- World Health Organization. Guidelines for surveillance of congenital rubella syndrome (CRS) and rubella - Field test version, May 1999. Geneva 1999. WHO/V&B/99.22; se puede obtener de Immunization, Vaccines and Biologicals, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland y consultar en internet en <http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF99/www9934.pdf>
- World Health Organization Reporting on a meeting on preventing congenital rubella syndrome (CRS): immunization strategies, surveillance needs, Geneva, 12–14 January 2000. Geneva 2000. WHO/V&B/00.10; se puede obtener de Immunization, Vaccines and Biologicals, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland y consultar en internet en: <http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF00/www508.pdf>.
- World Health Organization. Rubella vaccines: WHO position paper. Wkly Epidemiol Rec, 2000. 75: p 161–169. Consultable en internet en <http://www.who.int/wer/pdf/2000/wer7520.pdf>

10.3 Laboratorio

- Featherstone, D.A., D.W.G. Brown and R. Sanders. Development of the global measles laboratory network. J. Infect. Dis. 2003. 187: p S264-S269.
- Bellini, W.J. and R.F. Helfand. The Challenges and Strategies for Laboratory Diagnosis of Measles in an International Setting. J. Infect. Dis. 2003. 187: p S283-S290.
- World Health Organization. Global distribution of measles and rubella genotypes – update. Wkly Epidemiol Rec, 2006. 81: p 474–480. Consultable en internet en: <http://www.who.int/wer/2006/wer815152/en/index.html>
- Dietz, V., J. Rota, H. Izurieta, P. Carrasco and W. Bellini. The laboratory confirmation of suspected measles cases in settings of low measles transmission: conclusions from the experience of the Americas. Bull World Health Organization, 2004. 82(11): p852-857. Consultable en internet en: [http://whqlibdoc.who.int/bulletin/2004/Vol82-No11/bulletin_2004_82\(11\)_852-857.pdf](http://whqlibdoc.who.int/bulletin/2004/Vol82-No11/bulletin_2004_82(11)_852-857.pdf)
- Bellini W.J. and P.A. Rota. Genetic Diversity of Wild-Type Measles Viruses: Implications for Global Measles Elimination Programs. Emerging Infectious Diseases 1998. 4 (1): p 29-35 (Consultable en internet en: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol4no1/adobe/bellini.pdf>)

- World Health Organization. Global measles and rubella laboratory network – update. Wkly Epidemiol Rec, 2005. 80: p 384–388. Consultable en internet en: <http://www.who.int/wer/2005/wer8044/en/index.html>
- World Health Organization. New genotype of measles virus and update on global distribution of measles genotypes. Wkly Epidemiol Rec, 2005. 80: p 347–351. Consultable en internet en: <http://www.who.int/wer/2005/wer8040/en/index.html>
- World Health Organization. Standardization of the nomenclature for genetic characteristics of wild-type rubella viruses. Wkly Epidemiol Rec, 2005. 80: p 126–132. Consultable en internet en: <http://www.who.int/wer/2005/wer8014/en/index.html>
- Centers for Disease Control and Prevention. Global network for measles surveillance. Genetic characterization and sequencing. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/measles/gcs.htm>
- World Health Organization. Acute flaccid paralysis surveillance: a global platform for detecting and responding to priority infectious diseases. Wkly Epidemiol Rec, 2004. 48: p 161–169. Consultable en internet en: <http://www.who.int/wer/2004/wer7948/en/index.html>
- World Health Organization. Polio Laboratory Manual. 4th ed. 2004. WHO/IVB/04.01. Se puede obtener de Immunization, Vaccines and Biologicals, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland y consultar en internet en: <http://www.who.int/vaccines/en/poliolab/WHO-Polio-Manual-9.pdf>

10.4 Seguridad y transporte de muestras de laboratorio

- World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual 3rd ed. 2004. WHO/CDS/CSR/LYO/2004.11 Se puede obtener de Communicable Disease Surveillance & Response (CSR), World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland y consultar en internet en: <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/en/Biosafety7.pdf>
- World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2007-2008. WHO/CDS/EPR/2007.2. Se puede obtener de Epidemic and Pandemic Alert and Response (EPR), World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland y consultar en internet en: http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_EPR_2007_2/en/index.html
- World Health Organization. Transport of Infectious Substances. Background to the amendments adopted in the 13th revision of the United Nations Model Regulations guiding the transport of infectious substances, 2004. WHO/CDS/CSR/LYO/2004.9. Se puede obtener de Communicable Disease Surveillance & Response (CDS), World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland y consultar en: http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/en/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_9Final.pdf

11. Bibliografía

1. Clements, C.J., et al., The epidemiology of measles. *World Health Stat Q*, 1992. 45(2-3): p. 285-91.
2. Progress in reducing global measles deaths: 1999-2004. *Wkly Epidemiol Rec*, 2006. 81(10): p. 90-94.
3. Robertson, S.E., et al., Rubella and congenital rubella syndrome: global update. *Rev Panam Salud Publica*, 2003. 14(5): p. 306-15.
4. Chapter 10. Measles, in *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases “The Pink Book”*. 2004, Centers for Disease Control and Prevention: Atlanta. p. 115-133.
5. Tulchinsky, T.H., et al., Measles control in developing and developed countries: the case for a two-dose policy. *Bull World Health Organ*, 1993. 71(1): p. 93-103.
6. Feigin, R.D. and J.D. Cherry, *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*. 4 ed, ed. R.D. Feigin, Cherry, J.D. 1997: W.B. Saunders. 2054-2074.
7. Redd, S.C., L.E. Markowitz, and K. S.L., Measles Vaccine, in *Vaccines*, S.A. Plotkin and W.A. Orenstein, Editors. 1999, W.B. Saunders: Philadelphia. p. 222–266.
8. Tipples, G.A., et al., Assessment of immunoglobulin M enzyme immunoassays for diagnosis of measles. *J Clin Microbiol*, 2003. 41(10): p. 4790-2.
9. Cutts, F., Module 7: Measles, in *The Immunological Basis for Immunization*. 1993, World Health Organization: Geneva.
10. New genotype of measles virus and update on global distribution of measles genotypes. *Wkly Epidemiol Rec*, 2005. 80(40): p. 347-351.
11. WHO-recommended standards for surveillance of selected vaccine-preventable diseases. 2003, World Health Organization, WHO/V&B/03.01
12. Griffin, D.E. and Bellini, W.J., Measles Virus, in *Fields Virology*, B.N. Fields, K. D.M., and P.M. Howley, Editors. 1996, Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia. p. 1267-1312.
13. Murray, P.R., et al., *Medical Microbiology*. 3 ed. 1998: Mosby-Year Book.
14. Chapter 12. Rubella, in *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases “The Pink Book”*. 2004, Centers for Disease Control and Prevention: Atlanta. p. 145-158.
15. Rubella Vaccines. WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 2000. 75(20): p. 161-169.
16. Plotkin, S.A., Rubella, in *Vaccines*, S.A. Plotkin and W.A. Orenstein, Editors. 1999, W.B. Saunders: Philadelphia. p. 409-440.
17. Wolinsky, J.S., Rubella, in *Fields' Virology*, B.N. Fields, D.M. Knipe, and P.M. Howley, Editors. 1996, Raven Press: New York. p. 899-929.
18. Standardization of the nomenclature for genetic characteristics of wild-type rubella viruses. *Wkly Epidemiol Rec*, 2005. 80(14): p. 126 - 132.
19. Material safety data sheet - infectious substances: Rubella virus., Public Health Agency of Canada, Office of Laboratory Security.
20. Best, J.M., et al., Interpretation of rubella serology in pregnancy--pitfalls and problems. *BMJ*, 2002. 325(7356): p. 147-8.

21. Thomas, H.I., et al., Simultaneous IgM reactivity by EIA against more than one virus in measles, parvovirus B19 and rubella infection. *J Clin Virol*, 1999. 14(2): p. 107-18.
22. Measles mortality reduction and Regional elimination. Strategic Plan 2001-2005. 2003, World Health Organization.
23. GIVS Global Immunization Vision and Strategy 2006-2015. World Health Organization and UNICEF. 2005, WHO/IVB/05.05
24. Global measles and rubella laboratory network – update. *Wkly Epidemiol Rec*, 2005. 80(44): p. 384-388.
25. Panagiotopoulos T, Antoniadou I, Valassi-Adam E. Increase in congenital rubella occurrence after immunisation in Greece: retrospective survey and systematic review. *BMJ* 1999; 319: p. 1462-1466.
26. Standardisation of the nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses. *Wkly Epidemiol Rec*, 1998. 73(35): p. 265-269.
27. Nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses (update, part I). *Wkly Epidemiol Rec*, 2001. 76(32): p. 242-247.
28. Nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses (update, part II). *Wkly Epidemiol Rec*, 2001. 76(33): p. 249-251.
29. Update of the nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses: new genotypes and reference strains. *Wkly Epidemiol Rec*, 2003. 78(27): p. 229-232.
30. Helfand, R.F., et al., Diagnosis of measles with an IgM capture EIA: the optimal timing of specimen collection after rash onset. *J Infect Dis*, 1997. 175(1): p. 195-9.
31. Cordoba, P., et al., Kinetics of rubella-specific IgM antibody response in postnatal rubella infection. *J Virol Methods*, 1991. 34(1): p. 37-43.
32. Mosquera Mdel, M., et al., Use of whole blood dried on filter paper for detection and genotyping of measles virus. *J Virol Methods*, 2004. 117(1): p. 97-9.
33. Chakravarti, A., D. Rawat, and S. Yadav, Whole blood samples as an alternative to serum for detection of immunity to measles virus by ELISA. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2003. 47(4): p. 563-7.
34. Condorelli, F., et al., Detection of immunoglobulin G to measles virus, rubella virus, and mumps virus in serum samples and in microquantities of whole blood dried on filter paper. *J Virol Methods*, 1994. 49(1): p. 25-36.
35. van Binnendijk, R.S., et al., Evaluation of serological and virological tests in the diagnosis of clinical and subclinical measles virus infections during an outbreak of measles in The Netherlands. *J Infect Dis*, 2003. 188(6): p. 898-903.
36. Vyse, A.J. and L. Jin, An RT-PCR assay using oral fluid samples to detect rubella virus genome for epidemiological surveillance. *Mol Cell Probes*, 2002. 16(2): p. 93-7.
37. Nigatu, W., et al., Measles virus strains circulating in Ethiopia in 1998-1999: molecular characterisation using oral fluid samples and identification of a new genotype. *J Med Virol*, 2001. 65(2): p. 373-80.
38. Ramsay, M.E., et al., Salivary diagnosis of rubella: a study of notified cases in the United Kingdom, 1991-4. *Epidemiol Infect*, 1998. 120(3): p. 315-9.
39. Riddell, M.A., et al., Detection of measles virus-specific immunoglobulin M in dried venous blood samples by using a commercial enzyme assay. *J. Clin Microbiol*, 2002. 40(1): p. 5-9
40. De Swart, R.L., et al., Combination of reverse transcriptase PCR analysis and immunoglobulin M detection on filter paper blood samples allows diagnostic and epidemiological studies of measles. *J. Clin Microbiol*, 2001. 39(1): p. 270-273

41. [Helfand, R.F.](#), et al., Comparative detection of measles and rubella IgM and IgG derived from filter paper blood and serum samples. *J Med Virol.* 2001. 65(4): p. 751-757.
42. [Karapanagiotidis T.](#), [Riddell M.](#), [Kelly H.](#), Detection of rubella immunoglobulin M from dried venous blood spots using a commercial enzyme immunoassay. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005 53(2): p.107-111.
43. World Health Organization, Laboratory Biosafety Manual. 3 ed. 2004, Geneva: World Health Organization.
44. Peltola, H. and O.P. Heinonen, Frequency of true adverse reactions to measles-mumps-rubella vaccine. A double-blind placebo-controlled trial in twins. *Lancet*, 1986. 1(8487): p. 939-42.
45. Ramsay, M., R. Brugha, and D. Brown, Surveillance of measles in England and Wales: implications of a national saliva testing programme. *Bull World Health Organ*, 1997. 75(6): p. 515-21.
46. Ramsay, M., et al., Causes of morbilliform rash in a highly immunised English population. *Arch Dis Child*, 2002. 87(3): p. 202-6.
47. Pancharoen, C., J. Mekmullica, and U. Thisyakorn, Primary dengue infection: what are the clinical distinctions from secondary infection? *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2001. 32(3): p. 476-80.
48. Tipples, G.A., et al., Evaluation of rubella IgM enzyme immunoassays. *J Clin Virol*, 2004. 30(3): p. 233-8.
49. Enders, G. and F. Knotek, Comparison of the performance and reproducibility of various serological methods and diagnostic kits for the detection of rubella antibodies. *J Virol Methods*, 1985. 11(1): p. 1-14.
50. Morgan-Capner, P., R.S. Tedder, and J.E. Mace, Rubella-specific IgM reactivity in sera from cases of infectious mononucleosis. *J Hyg (Lond)*, 1983. 90(3): p. 407-13.
51. Hedman, K. and I. Seppala, Recent rubella virus infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J Clin Immunol*, 1988. 8(3): p. 214-21.
52. Enders, G. and F. Knotek, Rubella IgG total antibody avidity and IgG subclass-specific antibody avidity assay and their role in the differentiation between primary rubella and rubella reinfection. *Infection*, 1989. 17(4): p. 218-26.
53. Tatsuo, H., et al., SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature*, 2000. 406(6798): p. 893-7.
54. Kouomou, D.W. and T.F. Wild, Adaptation of wild-type measles virus to tissue culture. *J Virol*, 2002. 76(3): p. 1505-9.
55. Ono et al. Measles Viruses on Throat Swabs from Measles Patients Use Signaling Lymphocytic Activation Molecule (CDw150) but Not CD46 as a Cellular Receptor *J. Virol.*, 2001. 75: p. 4399-4401.