



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA

Facultad de Ciencias de la Salud
Departamento de Ciencias Clínicas II
Programa de Doctorado de Microbiología y Parasitología

**DESARROLLO DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE VIRUS
EXANTEMÁTICOS. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL
VIRUS DEL SARAMPIÓN EN ESPAÑA.**

Tesis Doctoral presentada por D^a María del Mar Mosquera Gutiérrez

Dirigida por el Dr. D. Juan Emilio Echevarría Mayo

Madrid, a 15 de febrero de 2010



Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que de una forma u otra me han empujado a escribir y me han demostrado su apoyo en tan ardua tarea. A Juan, que tuvo toda la paciencia que tiene la versión atea del santo Job. A Fernando, cuya contribución y apoyo han sido como mínimo estimulante. A Paco que comprendía perfectamente lo que significaba para mí tener que escribir la tesis. A Carolina que supo traspasarme un poco de toda su energía. A Ana Avellón que ha sido un ejemplo de voluntad permanente. A Inma que se ha “tragado este tocho”. A Sonia, Ana Bárcena, Quique, Alex y Marta que estuvieron ahí para aguantarme, tarea nada fácil. A Lourdes que me empujó gracias a una apuesta. A Juan Carlos que me brindó su ayuda y conocimientos. A Conchita, Irene, Ana, Paloma, Carmen, Manolo, Paco, José Miguel, Nieves, Lala, Lourdes, Isabel y Jesús por su inestimable trabajo. A Teo y Pilar que me decían “sin prisa pero sin pausa”, y desde luego lo hice “sin prisa”. A todos, que sois parte de este trabajo, muchas gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
1. VIRUS DEL SARAMPIÓN.....	5
1.1 Estructura y composición	5
1.2 Ciclo de replicación del virus.....	8
1.3 Patogenia	9
1.3.1 Virulencia	11
1.3.2 Infección persistente.....	11
1.4 Respuesta inmune.....	12
1.4.1 Inmunidad humoral	13
1.4.2 Inmunidad celular.....	13
1.4.3 Supresión inmune	14
1.4.4 Autoinmunidad.....	14
1.5 Manifestaciones clínicas	14
1.6 Diagnóstico.....	17
1.7 Epidemiología	18
1.8 Profilaxis. Vacuna triple vírica.....	25
1.8.1 Pautas y vías de administración.	26
1.8.2 Contraindicaciones.....	28
1.8.3 Efectos secundarios.....	28
1.8.4 Futuro de la vacuna triple vírica.....	29
2. CONTROL DEL SARAMPIÓN.....	30
3. OTROS VIRUS PRODUCTORES DE EXANTEMA	36
3.1 Virus de la rubéola.	36
3.1.1 Manifestaciones clínicas.	37
3.1.2 Epidemiología y control.....	39
3.1.3 Diagnóstico.....	40
3.2 Parvovirus B19.....	42
3.2.1 Manifestaciones clínicas.	43
3.2.2 Epidemiología.	44

3.2.3 Diagnóstico.....	45
3.3 Otros virus exantemáticos.....	46
3.3.1 Adenovirus.....	46
3.3.2 Enterovirus.....	47
3.3.3 Herpesvirus.....	49
3.3.4 Virus del dengue.....	51
OBJETIVOS.....	53
MATERIAL Y MÉTODOS	57
1. MUESTRAS Y CEPAS.....	59
1.1 Cepas de virus.....	59
1.2 Muestras post-vacunación y del biobanco del ISCIH.....	59
1.3 Muestras clínicas del Plan Nacional de Eliminación del Sarampión.....	60
1.4 Muestras de sangre seca en papel de filtro y exudado faríngeo en tampón de lisis de extracción de ácidos nucleicos.....	63
1.5 Muestras clínicas de exantema vírico infantil en el contexto de una alta cobertura de vacunación con triple vírica.....	65
2. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO.....	66
2.1 Sarampión.....	67
2.2 Rubéola.....	67
2.3 Parvovirus B19.....	68
2.4 Otros virus.....	68
3. AISLAMIENTO EN CULTIVO CELULAR	68
3.1 Pretratamiento de las muestras.....	68
3.2 Muestras post-vacunación y del biobanco del ISCIH.....	69
3.3 Muestras clínicas del Plan Nacional de Eliminación del Sarampión.....	69
3.4 Muestras clínicas de exantema vírico infantil en el contexto de una alta cobertura de vacunación con triple vírica.....	70
4. MÉTODOS DE AMPLIFICACIÓN GENÓMICA	70
4.1 Extracción de ácidos nucleicos.....	71
4.2 PCR de enterovirus-herpesvirus.....	71
4.3 PCR de adenovirus.....	71
4.4 Purificación de los productos de la PCR de genotipificado de MeV.....	71
4.5 Secuenciación de ácidos nucleicos.....	72
4.6 Análisis de secuencias de ácidos nucleicos.....	72
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	73

RESULTADOS	75
1. DESARROLLO DE UNA PCR MÚLTIPLE PARA VIRUS DEL SARAMPIÓN, DE LA RUBÉOLA Y PARVOVIRUS B19.....	77
1.1 Diseño de los iniciadores o “primers”.....	77
1.2 Ajuste de parámetros de primera reacción de PCR.....	79
1.3 Ajuste de parámetros de segunda reacción de PCR o anidada.....	82
1.4 Inclusión de un control interno.....	84
1.5 Obtención de un control positivo de ADN cuantificable de cada virus.....	85
2. EVALUACIÓN DE LA PCR MÚLTIPLE.....	85
2.1 Sensibilidad y especificidad de la PCR múltiple de exantemáticos.....	85
2.2 Valoración de la PCR múltiple de exantemáticos en muestras clínicas del biobanco del ISCIII y en muestras clínicas post-vacunación.	87
3. VALORACIÓN DE LA PCR MÚLTIPLE EN EL CONTEXTO DE UN BROTE DE MeV OCURRIDO EN LA PROVINCIA DE ALMERÍA.....	89
3.1 Marcadores de infección.	89
3.2 Caracterización de casos PCR positiva e IgM negativa.	91
4. PCR, GENOTIPIFICADO Y DETECCIÓN DE IgM EN SANGRE SECA EN PAPEL DE FILTRO Y EXUDADO FARÍNGEO EN TAMPÓN DE LISIS.....	94
4.1 Brote de sarampión en Guinea Ecuatorial en 2001.....	94
4.2 Brote de sarampión en Guinea Ecuatorial en 2008.....	95
5. ESTUDIO DE EXANTEMA VÍRICO INFANTIL EN EL CONTEXTO DE UNA ALTA COBERTURA DE VACUNACIÓN CON TRIPLE VÍRICA.....	96
6. DESARROLLO DE UNA PCR PARA GENOTIPIFICADO DEL VIRUS DEL SARAMPIÓN	98
6.1 Diseño de los iniciadores o “primers”.....	98
6.2 Ajuste de parámetros de primera reacción de PCR.....	101
6.3 Ajuste de parámetros de segunda reacción de PCR o anidada.....	103
6.4 Secuenciación.....	106
6.6 Análisis de la secuencia.....	108
7. GENOTIPOS DE MeV ENCONTRADOS EN ESPAÑA, 2001-2008	108
8. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE GENOTIPO A	116
9. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE GENOTIPO B3.....	119
10. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE GENOTIPO C2.....	126
11. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE GENOTIPO D3	129
12. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE GENOTIPO D4	130

13. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE GENOTIPO D5	136
14. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE GENOTIPO D6	139
15. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE GENOTIPO D7	143
16. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE GENOTIPO D8	145
17. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE GENOTIPO D9	147
18. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE GENOTIPO H1	148
19. ANÁLISIS DE VARIABILIDAD MOLECULAR EN EL CONTEXTO DE BROTOS.....	152
DISCUSIÓN.....	155
CONCLUSIONES	171
BIBLIOGRAFÍA.....	175
ARTÍCULOS	193

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia anual de sarampión en España, 1940-1999. Cobertura de vacunación contra el sarampión, 1978-1999.	20
Figura 2. Distribución de genotipos del MeV, 1995-2006.	23
Figura 3. Cobertura de la vacuna de MeV en la Región Europea de la OMS, 2008 (primera y segunda dosis).....	33
Figura 4. Ficha epidemiológica de caso sospechoso de sarampión.....	62
Figura 5. Iniciadores de cada virus.....	78
Figura 6. Estandarización de la concentración de SO ₄ Mg para B19V.	79
Figura 7. Estandarización combinada de la concentración de iniciadores y dNTPs en el caso de MeV.	80
Figura 8. Estandarización de la temperatura de hibridación de MeV.....	80
Figura 9. Estandarización de la temperatura de desnaturalización para los tres virus, RUBV, MeV y B19V.	81
Figura 10. Estandarización de la concentración de Cl ₂ Mg para los tres virus.....	82
Figura 11. Estandarización de la concentración de desoxinucleótidos trifosfato e iniciadores para MeV, RUBV y B19V.	82
Figura 12. Estandarización de la temperatura de hibridación a 50, 55, 60 y 65°C.....	83
Figura 13. Estandarización de la temperatura de desnaturalización de MeV, RUBV y B19V a 92, 93, 94 y 95°C.	83
Figura 14. Inclusión de un control interno.....	85
Figura 15. Bandas de RUBV (289 pb), MeV (229pb), B19V (94 pb) y control interno (140 pb) obtenidas con la PCR múltiple de exantemáticos.	86
Figura 16. ID ₅₀ de cultivo de MeV vacunal en B95a detectada por PCR.....	86
Figura 17. ID ₅₀ de cultivo de RUBV vacunal en RK13 detectada por PCR.....	87
Figura 18. Distribución por edad de los casos positivos a MeV.....	89
Figura 19. Esquema de resultados obtenidos en el brote de Almería.	90
Figura 20. Distribución de los resultados de la detección de IgM en suero (IgM), resultados de PCR en suero (PCR S), resultados de PCR en exudado faríngeo (PCR F), resultados de PCR en orina (PCR Or) y aislamiento de SAR en orina (Cult Or) en porcentaje, por día después de la aparición del exantema.	90
Figura 21. Número de infecciones por edad incluyendo infecciones dobles y la única triple.	97
Figura 22. Porcentaje de infecciones por edad.	97
Figura 23. Gráfico de similaridad entre secuencias completas del genoma de los genotipos D3, D6 y H1 respecto a la secuencia K01711 de genotipo A.....	99
Figura 24. Iniciadores de MeV para PCR de genotipificado.	100
Figura 25. Estandarización de la concentración de SO ₄ Mg..	101
Figura 26. Estandarización de la concentración de desoxinucleótidos trifosfato e iniciadores.	102
Figura 27. Estandarización de la temperatura de hibridación: 45, 50, 55 y 60°C.....	102

Figura 28.	Estandarización de la temperatura de desnaturalización: 92, 93, 94 y 95°C.	102
Figura 29.	Determinación del número de ciclos de la primera reacción.	103
Figura 30.	Estandarización de la concentración de Cl_2Mg	104
Figura 31.	Estandarización de la concentración de desoxinucleótidos trifosfato e iniciadores.	104
Figura 32.	Estandarización de la temperatura de hibridación entre 50, 55, 60 y 65°C.	105
Figura 33.	Estandarización de la temperatura de desnaturalización a 92, 93, 94 y 95°C.....	105
Figura 34.	Cromatograma de una secuencia de MeV obtenida con ABI PRISM 3700.	107
Figura 35.	Genotipos detectados en España en el periodo 2001-2008 por Comunidad Autónoma.....	111
Figura 36.	Filograma de secuencias encontradas en España en el periodo enero 2001-diciembre 2008 y secuencias de referencia de cada genotipo.	111
Figura 37.	Distancias por pares de Clustal W (Equilibrado) entre los genotipos de referencia de MeV y las secuencias españolas de genotipo D5.	114
Figura 38.	Distancias por pares de Clustal W (Equilibrado) entre los genotipos de referencia de MeV y la secuencia española de genotipo D9.	115
Figura 39.	Filograma de secuencias pertenecientes al genotipo A.	116
Figura 40.	Filograma de secuencias pertenecientes al genotipo B3.....	119
Figura 41.	Filograma de secuencias pertenecientes al genotipo C2.....	126
Figura 42.	Filograma de secuencias pertenecientes al genotipo D3.	129
Figura 43.	Filograma de secuencias pertenecientes al genotipo D4.	130
Figura 44.	Filograma de secuencias pertenecientes al genotipo D5.	136
Figura 45.	Filograma de secuencias pertenecientes al genotipo D6.	139
Figura 46.	Filograma de secuencias pertenecientes al genotipo D7.	143
Figura 47.	Filograma de secuencias pertenecientes al genotipo D8.	145
Figura 48.	Filograma de secuencias pertenecientes al genotipo D9.	147
Figura 49.	Filograma de secuencias pertenecientes al genotipo H1.	148

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Cepas de referencia de genotipos de MeV definidas por la OMS en 2005.	23
Tabla 2.	Porcentaje de coberturas de vacunación Sarampión-Rubéola-Parotiditis (SRP). Total Nacional, 2003-2007.....	26
Tabla 3.	Niños de 1 a 2 años de edad vacunados con una primera dosis de vacuna triple vírica (SRP) y niños de 3 a 6 años vacunados con segunda dosis. Año 2007.....	26
Tabla 4.	Incidencia de sarampión en España, 2001-2008.	35
Tabla 5.	Casos del Plan Nacional de Eliminación del Sarampión estudiados en el CNM desde el año 2001.	63
Tabla 6.	Casos del Plan Nacional de Eliminación del Sarampión recibidos en el CNM por CCAA y año, indicando cuantos tienen un grupo completo de muestras.	63
Tabla 7.	Pruebas serológicas realizadas en un panel de muestras de niños con exantema de la Comunidad Autónoma de Madrid.	66
Tabla 8.	Resultados de muestras clínicas con la RT-PCR múltiple de exantemáticos (MeV, RUBV, B19V).	88
Tabla 9.	Resultados en casos IgM negativa.....	93
Tabla 10.	Resultados de IgM y PCR sobre sangre completa secada en papel de filtro, 2001.	95
Tabla 11.	Resultados de IgM y PCR sobre sangre completa secada en papel de filtro, 2008.	96
Tabla 12.	Genotipos de MeV encontrados en España en el período 2001-2008.....	110
Tabla 13.	Comparación de las sustituciones nucleotídicas entre la vacuna utilizada en nuestro país, las secuencias de genotipo A detectadas en España y las secuencias próximas detectadas en otros países.	118
Tabla 14.	Comparación de las sustituciones nucleotídicas entre secuencias del caso de Madrid de 2001 procedente de Guinea Ecuatorial, del brote de Guinea Ecuatorial del mismo año y de las secuencias próximas detectadas en otros países.	120
Tabla 15.	Cambios nucleotídicos y aminoacídicos producidos durante el brote de Almería 2003.....	121
Tabla 16.	Cambios nucleotídicos y aminoacídicos producidos durante el brote de Madrid 2006.....	122
Tabla 17.	Comparación de las sustituciones nucleotídicas entre secuencias de los brotes de Madrid, Las Palmas y casos esporádicos de Valencia y Santander; y secuencias próximas detectadas en otros países.	123
Tabla 18.	Comparación de las sustituciones nucleotídicas entre una secuencia esporádica de Málaga, un caso del brote ocurrido en Malmoe (Suecia) y secuencias próximas detectadas en otros países.	123
Tabla 19.	Sustituciones nucleotídicas entre secuencias del brote de Alorcón y de Guinea Ecuatorial, 2008.	124
Tabla 20.	Cambios nucleotídicos y aminoacídicos producidos durante el brote de Alorcón y el de Guinea Ecuatorial 2008.	125
Tabla 21.	Sustituciones nucleotídicas entre secuencias C2 detectadas en España y otras secuencias próximas detectadas en otros países.....	128

Tabla 22.	Sustituciones nucleotídicas entre las secuencias de Valencia y Rusia.	131
Tabla 23.	Sustituciones nucleotídicas entre la secuencia de los brotes de Madrid y Londres del año 2005 y otras secuencias próximas detectadas en otros países.	132
Tabla 24.	Cambios nucleotídicos y aminoacídicos producidos durante el brote de Barcelona 2006-2007.	133
Tabla 25.	Sustituciones nucleotídicas entre la secuencia de los brotes de Barcelona, Soria e Italia del año 2006-2007 y otras secuencias próximas detectadas en otros países.	133
Tabla 26.	Sustituciones nucleotídicas entre la secuencia de los brotes de Cádiz-Ceuta y otras secuencias próximas detectadas en otros países.	134
Tabla 27.	Cambios nucleotídicos y aminoacídicos producidos durante el brote de Algeciras (Cádiz) en 2008.	135
Tabla 28.	Sustituciones nucleotídicas entre las secuencias de los brotes de Barcelona y otras secuencias próximas detectadas en otros países.	137
Tabla 29.	Sustituciones nucleotídicas entre la secuencia de los brotes de Madrid y Logroño, un caso esporádico de Valencia y otras secuencias próximas detectadas en otros países.	141
Tabla 30.	Sustituciones nucleotídicas entre la secuencia del brote de Santa Cruz de Tenerife y otras secuencias próximas detectadas en otros países.	141
Tabla 31.	Sustituciones nucleotídicas entre las secuencias españolas de 2006 y la que circuló durante los años 1993-1997.	142
Tabla 32.	Sustituciones nucleotídicas entre las secuencias D7 españolas y otras secuencias próximas detectadas en otros países.	144
Tabla 33.	Sustituciones nucleotídicas entre las secuencias D8 españolas y otras secuencias próximas detectadas en otros países.	146
Tabla 34.	Sustituciones nucleotídicas entre la secuencia D9 de Granada y otras secuencias próximas detectadas en otros países.	147
Tabla 35.	Sustituciones nucleotídicas entre la secuencia H1 de Ibiza y otras secuencias próximas detectadas en otros países.	149
Tabla 36.	Sustituciones nucleotídicas entre la secuencia H1 de Santa Cruz de Tenerife y otras secuencias próximas detectadas en otros países.	150
Tabla 37.	Sustituciones nucleotídicas entre la secuencia H1 de Badajoz y otras secuencias próximas detectadas en otros países.	151
Tabla 38.	Variaciones encontradas en brotes de más de cien casos en relación a la posición nucleotídica y al ciclo de replicación.	153

ABREVIATURAS

aa: Aminoácidos.

AdV: Adenovirus.

AIS: Actividades de Inmunización Suplementarias.

APCR: Aplasia pura de células rojas.

B19V: Parvovirus B19.

B95: Línea celular linfoide de mono tití.

CAT: Crisis aplásica transitoria.

CCAA: Comunidades Autónomas.

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato.

dATP: Desoxiadenina trifosfato.

dGTP: Desoxiguanina trifosfato.

dCTP: Desoxicitosina trifosfato.

dTTP: Desoxitimina trifosfato.

ECP: Efecto citopático.

ELISA: "Enzyme-linked immunosorbent assay" o Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.

EV: Enterovirus.

HHV-1: Herpesvirus humano 1 o virus del herpes simple 1.

HHV-2: Herpesvirus humano 2 o virus del herpes simple 2.

HHV-3: Herpesvirus humano 3 o virus varicela-zoster.

HHV-4: Herpesvirus humano 4 o virus Epstein-Barr.

HHV-5: Herpesvirus humano 5 o citomegalovirus.

HHV-6: Herpesvirus humano 6.

HHV-7: Herpesvirus humano 7.

HLA: Antígenos leucocitarios humanos.

IA: Índice de avidéz.

IF: Inmunofluorescencia.

IFN- α : Interferón alfa.

IFN- β : Interferón beta.

IFN- γ : Interferón gamma.

IPTG: Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido.

ISCI II: Instituto de Salud Carlos III.

Kb: Kilobases.

Kd: Kilodaltons.

LCR: Líquido cefalorraquídeo.

LFA-1: Antígeno 1 asociado a función linfocitaria.

MeV: Virus del sarampión.

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.

nt: Nucleótidos

OMS: Organización Mundial de la Salud.

ORF: Marcos de lectura abierta.

pb: Pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, "polymerase chain reaction".

PEES: Panencefalitis esclerosante subaguda.

PPR: Panencefalitis progresiva por rubéola.

PRV: Virus de la pseudorrabia.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

RE: Retículo endoplasmático.

RUBV: Virus de la rubéola.

SN: Sistema nervioso.

SNC: Sistema nervioso central.

SRC: Síndrome de rubéola congénita.

SRP: Vacuna triple vírica: sarampión, rubéola y parotiditis.

Vero-hSLAM: Línea celular de riñón de mono verde africano con receptor CD150 o SLAM.

X-Gal: 5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-beta-D-galactopiranosido.

RESUMEN

En el año 2001 se inició el Plan de Eliminación de Sarampión en España, que supuso una nueva estrategia de vigilancia epidemiológica de máxima sensibilidad a través de la detección de todos los brotes y casos esporádicos y su caracterización por laboratorio incluyendo el genotipo del virus. Con esta finalidad, se desarrollaron dos técnicas de amplificación genómica, una RT-PCR múltiple que detecta simultáneamente MeV, RUBV y B19V con fines diagnósticos, y otra cuyo objetivo es genotipificar MeV mediante el análisis de las secuencias virales directamente detectadas.

La sensibilidad, especificidad y el rendimiento diagnóstico de la RT-PCR múltiple se evaluó con muestras clínicas con resultados altamente satisfactorios, demostrándose que la detección de ARN de MeV por PCR tanto en muestras de orina como exudado faríngeo proporciona un marcador complementario e incluso más sensible que la detección de IgM específica cuando las muestras se recogen en los tres primeros días desde la aparición del exantema. Asimismo, esta evaluación se extendió al estudio del rendimiento de muestras de fácil extracción y susceptibles de ser transportadas a temperatura ambiente, para su uso en estudios de campo en condiciones desfavorables.

El estudio de la circulación de genotipos de MeV entre 2001 y 2008 ha mostrado una gran variedad de los mismos, sin que se haya manifestado el predominio de ninguno de ellos. Esto sugiere que actualmente no hay circulación autóctona, sino una sucesión de brotes importados, confirmando las conclusiones del análisis de los datos epidemiológicos. En la mayoría de los casos, el estudio del genotipo de MeV ha permitido corroborar los datos epidemiológicos sobre el origen geográfico de la importación, o establecer una hipótesis en ausencia de estos. Dichos orígenes están, en general, en concordancia con nuestros lazos geográficos y culturales, destacando como principal origen de importación a Europa (genotipos D7, D4, D6, B3), seguida de África (C2, B3 y quizás D8 y D4) y finalmente de Asia (D3, D5, D9, H1), en ausencia de circulación del MeV en América. Finalmente, en una población pediátrica con altos niveles de cobertura vacunal frente a sarampión y rubéola; el HHV-6, los enterovirus y el HHV-4 han demostrado ser los principales agentes productores de cuadros exantemáticos.

INTRODUCCIÓN

Se puede definir exantema como una erupción eritematosa difusa, de distribución variable, habitualmente autolimitada, formada por lesiones de características morfológicas variables (máculas, pápulas o vesiculopústulas). Un exantema puede deberse a la expresión de una serie de procesos diferentes, como infecciosos, inmunológicos o expresión de reacciones adversas a fármacos.

El carácter benigno y autolimitado de la mayoría de las enfermedades virales exantemáticas, hace que habitualmente no sea fundamental para el manejo del paciente conocer el virus responsable de la misma. Sólo en situaciones concretas, como el embarazo, la inmunosupresión, situaciones de riesgo o vigilancia epidemiológica puede hacerse totalmente necesario identificar el agente etiológico responsable.

1. VIRUS DEL SARAMPIÓN

1.1 Estructura y composición

El virus del sarampión (MeV) pertenece al género *Morbillivirus* de la subfamilia *Paramyxovirinae*, familia *Paramyxoviridae*, orden *Mononegavirales* [1].

La familia *Paramyxoviridae* posee un ARN monocatenario no segmentado de polaridad negativa. Los viriones del género *Morbillivirus* son pleomórficos y miden entre 100 y 300 nm. La envuelta del virus, constituida por una bicapa lipídica de origen celular, presenta proyecciones de 9 a 15 nm de longitud que están compuestas por las glicoproteínas transmembrana denominadas hemaglutinina (H) y fusión (F). La proteína matriz (M) se dispone entre la envuelta y la ribonucleoproteína dando cohesión al virión. Esta última incluye una molécula de ARN de 15.894 nucleótidos de polaridad negativa y tres proteínas asociadas: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P) y proteína "large" (L) formando una hélice. El virión también puede contener actina procedente del citoesqueleto celular, que se incorpora en el momento de emerger de la membrana plasmática. El genoma está constituido por seis unidades de transcripción que están separadas por secuencias intergénicas no-transcritas formadas por tres nucleótidos. Las seis unidades de transcripción están precedidas de una secuencia "líder" en 3' y van seguidas de una secuencia "trailer" en 5' [2, 3].

La primera unidad de transcripción corresponde a la **nucleoproteína (N)**, de 525 aminoácidos, y es la primera que se transcribe, por lo que es la más abundante de entre todas las proteínas virales. Su función principal es formar la cápsida viral. La señal específica de encapsidación se cree que se encuentra en los extremos 5' de las secuencias "líder" del antígenoma (ARN de polaridad positiva) y "trailer" del genoma del ARN. Sin embargo, en ausencia de fosfoproteína (y de ARN viral u otras proteínas víricas) las nucleoproteínas de los *Mononegavirales* son capaces de autoensamblarse entorno al ARN celular para formar partículas similares a la nucleocápsida que incluye el ácido nucleico y la cápsida. En células infectadas existen dos formas de N: una monomérica no ensamblada (N⁰), y una forma ensamblada (N^{NUC}). En la forma ensamblada, N interacciona con la fosfoproteína (P) y el complejo polimerasa (L-P), mientras que en la forma monomérica es responsable de la encapsidación de la cadena de ARN recién sintetizado durante la replicación. Durante el ensamblado del virus N interacciona con la proteína matriz (M). Otra de sus funciones es interactuar con factores celulares, incluyendo componentes del citoesqueleto [4].

La nucleoproteína presenta en el MeV dos módulos: un dominio N-terminal (N-CORE, aa 1-400) y un dominio C-terminal (N-TAIL, aa 401-525). N-CORE contiene todas las regiones necesarias para el autoensamblado y unión al ARN, forma un dominio globular localizado hacia el eje helicoidal de la nucleocápsida y puede reaccionar también con la superficie celular. Mientras que N-TAIL es análoga a una familia de proteínas que estructuralmente son similares a los dominios de activación de factores de transcripción celular. N-TAIL está localizada en el exterior de la estructura de N y sobresale de la superficie, está implicada en la inducción del plegamiento en la interacción con el dominio C-terminal de P (PCT) e interacciona con distintas proteínas de la célula hospedadora. N tiene varios lugares de unión para P en N-CORE y N-TAIL [5].

La segunda unidad de transcripción corresponde al gen P de MeV, también llamado P/V/C, el cual codifica, de forma solapada, varias proteínas incluyendo la fosfoproteína (P), la proteína C y la proteína V.

La **fosfoproteína**, de 507 aminoácidos, es un cofactor de la polimerasa que se activa por fosforilación, y une L a N para formar el complejo de la replicasa. La organización del gen P sugiere que la proteína P es modular, con al menos dos dominios: uno N-terminal (PNT) común con la proteína V y un dominio C-terminal

(PCT) único para la proteína P. La transcripción del genoma vírico necesita sólo el dominio PCT que se une a N_{TAIL} como parte de la estructura de la nucleocápsida y es responsable de la unión de la polimerasa L a su molde, mientras que la replicación también necesita el PNT mediante la unión a N^o [4].

La **proteína C**, de 186 aminoácidos, interfiere con la respuesta inmune innata inhibiendo la respuesta mediada por interferón, modula la actividad polimerasa vírica y ha sido implicada en la prevención de la muerte celular [2].

La **proteína V**, de 298 aminoácidos, afecta a la interacción N-P y puede interferir con la respuesta mediada por IFN en células infectadas por MeV [2].

Una cuarta proteína del gen P/V/C, R, cuya función se desconoce, se produce por cambio de posición en el ribosoma, lo cual permite el acceso a un marco de lectura abierto situado 24 nucleótidos antes del codón de terminación de la proteína V.

Una tercera unidad de transcripción se corresponde con la región codificadora de la proteína **matriz (M)**, de 335 aminoácidos. Esta proteína forma la envuelta del virión junto con las dos glicoproteínas transmembrana F y H. En células infectadas, M está asociada con la nucleocápsida y con la capa interna de la membrana plasmática. Parece interactuar con las regiones intracitoplasmáticas de una o ambas glicoproteínas transmembrana, modulando la capacidad de las glicoproteínas de la envuelta para alcanzar la diana y fusionarse con ella, y dirige la liberación del virus desde la superficie apical de las células epiteliales [6]. Cuando se une al complejo ribonucleoproteína, M inhibe la transcripción. La proteína M obtenida a partir de virus que causan infección persistente no tiene capacidad para unir nucleocápsidas e inhibir la transcripción del ARN [2].

La proteína de **fusión (F)**, que constituye la cuarta unidad de transcripción del genoma de MeV, es una glicoproteína transmembrana tipo I altamente conservada sintetizada como una proteína precursora inactiva (F₀) de unos 60 kd. F₀ se escinde para producir las proteínas F₁ y F₂, que unidas por un puente disulfuro suponen la proteína F activa. F₂ es necesaria para el procesamiento proteolítico y transporte a la superficie celular. Se ha postulado que F₁ juega un papel importante en la interacción con la proteína H y ambas en el proceso de fusión. El dominio citoplasmático de F está frecuentemente alterado en virus asociados con infección persistente, interfiriendo con el ensamblado de las proteínas virales y la salida de la envuelta del virus e incrementando la fusión entre células [2].

La proteína **hemaglutinina (H)**, quinta unidad de transcripción de 617 aminoácidos, es el lugar de unión al receptor celular y debido a su función hemaglutinante se considera un importante determinante del tropismo celular de los *Morbillivirus*. Carece de la función neuraminidasa que tienen otras proteínas similares de otros miembros de la familia *Paramyxoviridae*. Es una glicoproteína transmembrana tipo II y la cola citoplasmática es esencial en el transporte eficiente a la superficie celular para la liberación del virus. Actúa junto con la proteína F durante la fusión y entrada del virus. La proteína H se une a la proteína cofactor de membrana (CD46) mediante la hoja 4 en el lateral de la β -hélice, mientras que, el sitio de unión de CD150 (o SLAM) está asociado con los aminoácidos 429 al 438 de la hoja 5 de la β -hélice [2].

La proteína "**large**" (**L**) es la sexta unidad de transcripción del genoma y consta de 2183 aminoácidos. Es la ARN polimerasa ARN dependiente y está altamente conservada. Está presente en pequeñas cantidades en la célula infectada, interacciona y realiza su función ARN polimerasa en asociación con P, y es parte de la nucleocápsida viral en la célula y en el virión [2].

1.2 Ciclo de replicación del virus

En el caso del MeV el proceso de **adsorción celular** se inicia con la unión de la proteína H a los receptores CD46 y CD150/SLAM de la superficie celular, provocando la entrada al fusionarse la membrana viral con la membrana plasmática celular y liberando las nucleocápsidas en el citoplasma. Estudios de distintas cepas de MeV han mostrado que tanto las vacunales como las salvajes pueden usar SLAM como receptor. Sin embargo, las cepas salvajes a menudo no pueden usar CD46 eficientemente.

Los paramixovirus han desarrollado mecanismos de control de la **transcripción vírica** tanto del nivel, como del tipo de ARN vírico que se sintetiza. Al principio de la infección, antes de que se acumulen altos niveles de productos de la traducción viral, la función polimerasa vírica (ARNPv) está restringida a la producción de ARNs líder (polaridad +) y ARNm desde la nucleocápsida entrante, en la fase denominada transcripción primaria. Después de la entrada, la nucleocápsida se usa como molde para producir antigenomas (+), usados a su vez como moldes para producir

genomas ARN negativos. Cuando se han producido progenies abundantes de genomas, éstos sirven como moldes adicionales en la fase llamada transcripción secundaria para producir niveles mucho mayores de transcritos de ARNm vírico.

La **replicación** del MeV ocurre en el citoplasma. Después de la traducción y acumulación de proteínas virales, el genoma de sentido negativo se replica para producir una copia complementaria completa, antígenoma (+), que solamente se encuentra ensamblado con la proteína N. En este momento, la ARNPv copia el mismo molde y sintetiza una copia complementaria exacta (-). Se cree que la única función de este antígenoma es ser un intermediario en la replicación del genoma. La síntesis del genoma y la encapsidación parecen ocurrir concomitantemente. Los genomas negativos sintetizados pueden tener tres funciones: moldes de ARNm en la transcripción secundaria, moldes para antígenomas adicionales o incorporación en la progenie de viriones durante la salida de la célula.

El lugar de **ensamblaje** de la nucleocápsida es el citoplasma. Primero se produce la asociación de subunidades libres de N con el genoma para formar la nucleoproteína y, posteriormente, se asocia el complejo proteico P-L a dicha estructura. El ensamblado de la envuelta ocurre en la superficie celular. Las glicoproteínas víricas, sintetizadas en el retículo endoplasmático, maduran y se pliegan, y solamente las que están correctamente plegadas y ensambladas son transportadas fuera del retículo. En el aparato de Golgi se modifican las cadenas de carbohidratos y finalmente las glicoproteínas son transportadas a la membrana plasmática.

El mecanismo de **liberación** del virus es desconocido. Se cree que las proteínas M juegan un importante papel en llevar el núcleo ribonucleoproteico ensamblado al lugar de la membrana citoplasmática donde se formará una gemación [7].

1.3 Patogenia

El MeV se transmite por aerosoles y entra en el organismo a través de las vías respiratorias. La infección inicial se establece en el tracto respiratorio con una primera replicación en células epiteliales. Desde el tracto respiratorio se extiende a tejidos linfáticos locales, quizás gracias a macrófagos o células dendríticas. La replicación en tejido linfático produce aparición de células reticuloendoteliales o linfoides gigantes denominadas células Warthin-Finkeldey. Son células grandes de

aproximadamente 100 μm de diámetro que pueden contener 100 núcleos agregados, normalmente sin cuerpos de inclusión. Dichas células tienden a localizarse en la periferia de los centros germinales y en tejido linfoide submucoso.

La amplificación del virus en nódulos linfáticos regionales produce la aparición de viremia e infección de distintos órganos. Raramente se ha detectado viremia en plasma, ya que el virus se encuentra asociado a células y solamente antes de la aparición de anticuerpos neutralizantes, sin embargo se puede detectar ARN en plasma por PCR. La primera célula infectada son los monocitos. La infección de monocitos y macrófagos por algunas cepas de MeV aumenta la expresión de LFA-1, una molécula que promueve la adherencia a células endoteliales y puede contribuir a la diseminación del virus. Los linfocitos T y B pueden ser infectados *in vitro* y probablemente también *in vivo*.

Los órganos y tejidos linfáticos son lugares importantes para la replicación del virus. En el bazo, las áreas ricas en macrófagos son sitios primarios de replicación de MeV. En el timo, se infectan las células epiteliales, provocando apoptosis de timocitos y una disminución prolongada del grosor de la corteza del timo, mientras que otros tejidos linfáticos se recuperan rápidamente. El MeV también infecta otros órganos como piel, conjuntiva, riñón, pulmón, tracto gastrointestinal, mucosa respiratoria, mucosa genital e hígado. En estos lugares, el virus se replica primariamente en células endoteliales, epiteliales y/o monocitos y macrófagos. La infección endotelial está acompañada por dilatación vascular, permeabilidad vascular aumentada, infiltración de células mononucleares e infección de tejido próximo.

La histopatología del exantema por MeV sugiere que el inicio es la infección de las células endoteliales dérmicas. Posteriormente afecta a la epidermis, con infección de queratinocitos en el estrato granuloso que produce queratosis focal y edema. Se forman células epiteliales gigantes y se acumula un infiltrado mononuclear perivascular. Las manchas de Koplik de la mucosa oral son similares patológicamente al exantema e incluye a las glándulas submucosas. El examen patológico de otros tejidos muestra células epiteliales gigantes multinucleadas que se parecen a las que se forman en cultivos tisulares. Estas células se pueden localizar en secreciones nasales y conjuntiva durante el pródromo y primeros días del exantema. Las células epiteliales infectadas por MeV también se secretan con la orina [2].

Los datos epidemiológicos sugieren que las personas infectadas son infecciosas unos días antes del comienzo del exantema. En este momento el virus puede aislarse desde membranas mucosas de la nasofaringe, conjuntiva y boca, sugiriendo que el aparato respiratorio es el lugar de secreción del virus.

1.3.1 Virulencia.

Las cepas vacunales atenuadas de MeV pueden diferir claramente en su virulencia, puesto que apenas causan enfermedad en humanos, con respecto a las salvajes, que causan sarampión. La carencia de modelos animales adecuados ha impedido, en gran medida, los intentos de determinar las bases moleculares de los cambios en la virulencia. No se han descrito diferencias de virulencia entre los distintos genotipos del virus. Las cepas salvajes tienden a usar el receptor CD46 menos eficientemente que las cepas vacunales, pero no se ha demostrado que esto sea un determinante de virulencia. La atenuación en células Vero está asociada a cambios de aminoácidos en los genes P y L, pero los cambios específicos responsables de la disminución de virulencia no se conocen todavía.

1.3.2 Infección persistente.

El MeV puede establecer infección persistente tanto en células *in vitro* como *in vivo*. Se han establecido líneas celulares permanentemente infectadas con el virus, y la infección persistente de neuronas y células gliales puede dar lugar a enfermedad neurológica. Los elementos que determinan infección persistente no citopática frente a infección lítica no se comprenden completamente, pero a ello contribuyen tanto las propiedades de la célula infectada como del virus. La infección persistente no citopática se establece más fácilmente en células neuronales, pero se ha establecido también en líneas celulares linfoides, epiteliales y gliales. Algunos factores identificados que afectan a la capacidad de MeV para establecer y mantener la infección persistente son la expresión de proteínas de choque térmico, proteínas inducidas por IFN y la regulación del metabolismo lipídico.

Panencefalitis esclerosante subaguda (PEES). Es una enfermedad neurológica de curso progresivo y lento cuya patogénesis no es aún bien conocida. Probablemente el virus entra al cerebro en un momento dado (durante la infección aguda original posiblemente) y luego gradualmente se extiende. Cuando aparecen

los síntomas neurológicos, las neuronas y la glía contienen cuerpos de inclusión víricos en citoplasma y núcleo, la respuesta de anticuerpos frente al virus es alta en suero y LCR y hay una reacción inflamatoria mononuclear extensa en el SNC. Durante la enfermedad la replicación del virus es defectiva y se ha sugerido que el virus puede extenderse dentro del SNC por transmisión sináptica de la ribonucleoproteína de célula a célula. Se ha asociado diversas alteraciones en cualquiera de las proteínas de la envuelta del MeV, que de alguna manera interfieren en el ensamblado y salida de virus infecciosos, con infección persistente y PEES. Se ha visto que el virus tiene mutaciones en los genes que codifican las proteínas M, F y H con frecuencia.

Finalmente, se ha sugerido la posibilidad de que la PEES esté asociada a un defecto en la respuesta inmune. La respuesta local de anticuerpos frente a MeV está incrementada, siendo particularmente abundantes los anticuerpos contra las proteínas N y P presentes en el complejo ribonucleoproteína, mientras que los dirigidos contra la proteína M son particularmente deficientes. La actividad de células T citotóxicas específicas y la producción de IFN- γ está disminuida comparada con individuos seropositivos sanos. En cualquier caso, no hay evidencia de un defecto global en las respuestas inmunes, pero éstas son ineficaces en el aclaramiento del virus del SNC [2].

1.4 Respuesta inmune

La respuesta inmune ante MeV es importante para el aclaramiento del virus, la recuperación de la infección y el establecimiento de inmunidad a largo plazo, además es directamente responsable de varias de las manifestaciones clínicas del sarampión. El virus puede aislarse de orina hasta quince días después del exantema y el ARN viral puede detectarse durante muchas semanas, indicando que el aclaramiento viral completo es un proceso largo.

El comienzo de la enfermedad clínica coincide con la aparición de respuestas inmunes específicas. Se produce una marcada activación del sistema inmune frente al virus, que coincide con la aparición de la supresión inmune frente a antígenos diferentes a los del MeV. Ambas, supresión inmune genérica y activación de la

inmunidad específica, continúan muchas semanas después de la aparente recuperación.

La infección por MeV de células *in vitro* induce producción de interferón α y β , que disminuye la replicación del virus e incrementa la expresión de antígeno MHC de clase I en células infectadas. Las células asesinas naturales (NK) constituyen otro mecanismo temprano de defensa importante, pero su actividad es más baja de lo normal durante la enfermedad. Tanto el virus como las células infectadas activan la vía alternativa del complemento, independiente de anticuerpos, provocando que las células sean susceptibles a lisis por el complemento [2].

1.4.1 Inmunidad humoral.

Los anticuerpos se detectan por primera vez cuando aparece el exantema. El isotipo inicial es IgM, más tarde cambia a IgG en la fase de memoria. Inicialmente la IgG es de baja avidéz, pero ésta aumenta firmemente en varios meses. En diversas secreciones se ha encontrado IgA, IgM e IgG. Todos estos anticuerpos se producen frente a la mayoría de las proteínas virales.

Los que aparecen más temprano y en mayor abundancia son los anticuerpos frente a N. La proteína M induce solo pequeñas cantidades de anticuerpos, excepto en sarampión atípico. Los anticuerpos contra las proteínas H y F tienen actividad neutralizante, evitándose probablemente la adsorción y la fusión de la membrana vírica con la membrana celular [2].

1.4.2 Inmunidad celular.

La importancia de la inmunidad celular queda demostrada por la capacidad observada en niños con agammaglobulinemia para recuperarse completamente del sarampión, mientras que en niños con defectos graves en la función de linfocitos T a menudo se desarrolla enfermedad fatal o grave. En respuesta a la infección se activan células T CD8 y se establecen células T CD8 de memoria. Los antígenos que inducen células T citotóxicas CD8+ son las proteínas N, P, H y F.

También se activan células CD4+ en respuesta a la infección que proliferan durante el exantema, estimulando la producción y proliferación de citoquinas inducidas por MeV. Gracias a estudios epidemiológicos, se ha visto que la protección a largo plazo

no requiere una nueva exposición al virus. La memoria inmunológica incluye producción continua de anticuerpos y circulación de células T específicas de MeV [2].

1.4.3 Supresión inmune.

Existe evidencia *in vivo* e *in vitro* de supresión inmune durante el sarampión. Posiblemente es la base del aumento de susceptibilidad a otras infecciones víricas y bacterianas secundarias tan característico del sarampión. *In vivo*, la respuesta a pruebas epidérmicas de hipersensibilidad retardada, tales como la tuberculina, se encuentran suprimidas antes del exantema y durante varias semanas después de la recuperación. La producción de anticuerpos y de una respuesta celular ante nuevos antígenos está debilitada. El análisis de anomalías ocurridas *in vitro* sugiere defectos en la respuesta tanto de monocitos como de linfocitos [2].

1.4.4 Autoinmunidad.

La encefalomiелitis postinfecciosa, o encefalomiелitis diseminada aguda, supone una complicación importante del sarampión y está asociada con una respuesta inmune cruzada frente a la proteína básica de la mielina. El mecanismo de inducción no está claro. Las hipótesis expuestas incluyen presentación alterada de los antígenos de la mielina resultado de la infección de oligodendrocitos por MeV, mimetismo molecular de los antígenos de mielina por el MeV y regulación anómala de las respuestas inmunes [2].

1.5 Manifestaciones clínicas

El **sarampión clásico** se adquiere a través de aerosoles y tiene un período de incubación de 10 a 14 días. El período prodrómico comienza con fiebre (39-40°), malestar y anorexia, seguidos de tos, coriza y conjuntivitis. Un día antes del exantema aparece un enantema en la mucosa bucal y velo del paladar formado por unas manchas pequeñas con centro blanco o blanco azulado sobre una base eritematosa, son las manchas de Koplik, patognomónicas de la enfermedad, que persisten durante 2 ó 3 días. El período prodrómico acaba cuando aparece el exantema, eritematoso y maculopapular, en la cara y detrás de las orejas, extendiéndose en forma centrífuga al tronco y extremidades. En cara y tronco, con

frecuencia, se hace confluyente y empieza a desaparecer a los 3-4 días de la misma forma en que apareció, a veces con una ligera descamación que se hace muy evidente en niños desnutridos. La fiebre persiste 2 ó 3 días después del comienzo del exantema y la tos puede persistir otros 10 días. Puede producirse fotofobia, dolor de cabeza, dolor abdominal, linfadenopatía y esplenomegalia moderada. La enfermedad es transmisible desde tres días antes hasta 4 días después de la aparición del exantema y la recuperación, cuando la enfermedad no se complica, comienza poco después de la aparición del exantema. [2, 8].

El MeV presenta afectación multiorgánica e infecta a células epiteliales, reticuloendoteliales y leucocitos, incluyendo monocitos, macrófagos y linfocitos T. La infección provoca disminución de linfocitos CD4 desde el comienzo del exantema hasta un mes después, y produce supresión de la hipersensibilidad de tipo retardado como se puede ver por la detección de anergia a antígenos de la piel, incluyendo la prueba de la tuberculina. Se han observado complicaciones en todos los sistemas orgánicos [8].

Aunque se puede producir pericarditis o miocarditis (detectadas por electrocardiografía aunque sin importancia clínica) o diarrea en el 2,5% de los casos (más frecuente en niños desnutridos, en general asociada con los vómitos que pueden aparecer en la fase aguda) las complicaciones más frecuentes del sarampión afectan al sistema respiratorio, o al sistema nervioso central [9].

Los **síntomas respiratorios** se deben a inflamación de la mucosa en respuesta a la infección de las células epiteliales. La neumonitis intersticial resultante de la replicación del virus y la inflamación del tracto respiratorio inferior es común en la enfermedad no complicada y frecuentemente se detecta sólo por radiografía o midiendo el gradiente de oxígeno alveolo-arterial. Es más probable que la neumonitis sea más grave clínicamente durante el embarazo. En individuos con compromiso del sistema inmune se puede producir neumonía de células gigantes, aunque la mayoría de las neumonías graves producidas como complicación del sarampión y que se complican con enfermedad pulmonar crónica se deben a infecciones bacterianas secundarias favorecidas por la supresión inmune. Otras complicaciones respiratorias comunes causadas por infecciones secundarias son otitis media y laringotraqueobronquitis. Además de un incremento de susceptibilidad a nuevas infecciones, se pueden reactivar infecciones virales y bacterianas latentes [2].

La aparición ocasional de enfermedad neurológica progresiva (encefalitis con cuerpos de inclusión) en pacientes inmunodeprimidos y de enfermedad neurológica tardía (PEES) indica que el virus accede al cerebro e infecta neuronas y células de la glía.

La **encefalomielitis postinfecciosa** afecta a 1 de 1000 casos de sarampión, mayoritariamente en individuos de más de 2 años de edad. La proporción de afectados es mayor en adolescentes y adultos que en niños en edad escolar. Normalmente ocurre en las 2 primeras semanas después de la aparición del exantema y clínicamente se caracteriza por un comienzo abrupto de fiebre acompañada de convulsiones, alteración del estado mental y signos neurológicos multifocales. Aproximadamente el 25% de pacientes fallece y un 33% de supervivientes tienen secuelas neurológicas, incluyendo retraso grave, alteraciones motrices, ceguera y hemiparesia. Como ya se ha mencionado es una enfermedad desmielinizante asociada a una respuesta autoinmune frente a la proteína básica de la mielina. En esta afectación neurológica no hay evidencia del virus en el cerebro o LCR.

La **panencefalitis esclerosante subaguda** está causada por la persistencia del virus en el tejido del sistema nervioso central durante varios años, seguido de una infección lenta progresiva y desmielinizante que afecta a múltiples áreas del cerebro. Ocurre con una frecuencia de 1 entre 1.000.000 de individuos, sobre todo en menores de 20 años en los que la infección aguda ocurrió a una edad muy temprana. El período de incubación es de 7 a 10 años. La enfermedad se presenta con deterioro mental acompañado por alteraciones de la personalidad a menudo diagnosticadas erróneamente como trastornos psiquiátricos. Posteriormente aparecen mioclonías, cambios electroencefalográficos característicos, y deterioro neurológico progresivo marcado por atrofia óptica y mutismo aquinético. Los pacientes fallecen entre varios meses y años después del comienzo de la enfermedad. Los anticuerpos frente a MeV están elevados en suero y LCR, y se encuentran inclusiones en neuronas y células gliales [2, 9].

La **encefalitis con cuerpos de inclusión** afecta a personas con enfermedades como infección por VIH o leucemia. Comienza normalmente de 5 semanas a 6 meses después de la infección aguda por MeV. Se inicia con cambios del estado mental y convulsiones en ausencia de fiebre, más de un 80% de afectados fallecen en unas semanas [8].

Finalmente, el **tracto intestinal** también se infecta por el virus, ya que se han visto células gigantes en tinciones de biopsia gástrica y además se han producido varios casos de apendicitis antes y durante el exantema con células gigantes en el tejido del apéndice. Se produce diarrea sobre todo en menores de 5 y mayores de 30 años que comienza justo antes del inicio del exantema sugiriendo que el virus es responsable de la mayoría de los episodios de diarrea, aunque las infecciones secundarias por bacterias u otros virus pueden contribuir a la severidad y duración de la enfermedad [8].

1.6 Diagnóstico

Los síntomas de sarampión clásico son suficientes normalmente para diagnosticar clínicamente la enfermedad en situaciones de alta incidencia o brote epidémico. Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud ha establecido la definición de caso clínico de sarampión como la enfermedad caracterizada por exantema maculopapular generalizado de tres o más días, fiebre de más de 38°C y uno de los siguientes síntomas: tos, coriza o conjuntivitis. Esta definición es la que se utiliza en los países que poseen programas de eliminación de sarampión avanzados que incluyen la vigilancia epidemiológica de cada caso individual. En estos países se hace necesario el diagnóstico de laboratorio de los casos clínicamente sospechosos, con la finalidad de llevar a cabo una vigilancia virológica exhaustiva de cada caso esporádico y cada brote epidémico de exantema compatible con sarampión. Asimismo, es necesario establecer el diagnóstico diferencial con otros virus productores de exantema como son: rubéola, parvovirus B19, y si procede, por antecedente epidemiológico compatible, con dengue.

El diagnóstico de laboratorio del sarampión se realiza mediante aislamiento en cultivos celulares, o detección directa del virus, o mediante confirmación de una respuesta serológica específica reciente. El virus se puede aislar en cultivos celulares a partir de muestras de exudado faríngeo o lavado nasofaríngeo tomadas 2-3 días antes de aparecer el exantema, hasta 5-7 días post-exantema. La excreción en orina es más larga, pudiendo recuperarse hasta 15 días después del exantema. En la actualidad se recomienda la línea celular Vero/hSLAM ya que la línea anteriormente recomendada, B95a, es una línea transformada por HHV-4 y por tanto requiere su

transporte como sustancia infecciosa. La línea Vero/hSLAM es tan sensible como la B95 y además se puede usar para aislar RUBV [10]. El uso de esta línea celular ha aumentado la sensibilidad que ofrecía la línea Vero original, que carecía del receptor adecuado (CD150/SLAM) para la gran mayoría de virus salvajes. Por otra parte, el efecto citopático, que tanto en B95a como en Vero/hSlam consiste en la aparición de sincitios de hasta 50 núcleos rodeados de una sola membrana con la presencia de cuerpos de inclusión, aparece rápidamente en 24-48 horas. Sin embargo, un diagnóstico negativo mediante aislamiento requiere dos pases a los 7-9 días, de forma que el resultado negativo sólo se obtiene a los 14-18 días de recibida la muestra para su estudio y diagnóstico. Por ello, el aislamiento en cultivo celular no resulta el método más adecuado para el diagnóstico, aunque es el método de referencia y es de gran utilidad para la obtención de cepas del virus, permitiendo la realización de cualquier tipo de estudios posteriores.

La detección serológica de IgM específica frente al virus es el método diagnóstico de referencia de sarampión. La IgM se detecta desde los 3 días de la aparición del exantema hasta 2 meses. Los métodos más adecuados para su detección son técnicas en fase sólida, bien métodos indirectos de ELISA o IFI, o bien ELISA de captura de cadenas pesadas. Un resultado negativo en una muestra de suero con menos de 7 días de evolución requiere el estudio de una segunda muestra, para evidenciar seroconversión. En los últimos años se ha valorado el uso de muestras de saliva, o de sangre seca en papel de filtro, para el diagnóstico serológico de sarampión sin necesidad de punción venosa con un excelente rendimiento, ya que además, permite la detección de genomas víricos por PCR [11-18].

Las técnicas de amplificación de genomas de MeV por PCR mejoran la sensibilidad del diagnóstico etiológico, proporcionando resultados más rápidamente [19].

1.7 Epidemiología

El sarampión es una de las enfermedades de declaración obligatoria considerada altamente contagiosa. Se estima que alrededor del 76% de las personas con exposición doméstica al virus acaban infectándose, y que el número reproductivo básico (R_0) o número medio de casos secundarios producidos por un individuo infeccioso en una población susceptible y sin intervención, es de 15 a 20. La

transmisión es más eficiente a través de exposición directa a partir de un individuo infectado, pero el MeV puede sobrevivir durante horas en gotículas respiratorias y no es necesario el contacto directo.

No existe reservorio animal ni evidencia de infección latente o persistencia epidemiológicamente significativa. Por tanto, el mantenimiento del MeV en una población requiere un aporte continuo de individuos susceptibles. Puesto que los adultos suelen ser inmunes debido a exposición previa al virus, el sarampión endémico es, en principio, una enfermedad infantil. Si la población es demasiado pequeña para establecer una transmisión endémica, el virus no puede mantenerse mediante cadenas de transmisión. Se ha observado gracias a modelos matemáticos y a estudios realizados en islas y ciudades con poblaciones de diferentes dimensiones, que se requiere de 250.000 a 500.000 habitantes para establecer la enfermedad en términos de endemidad.

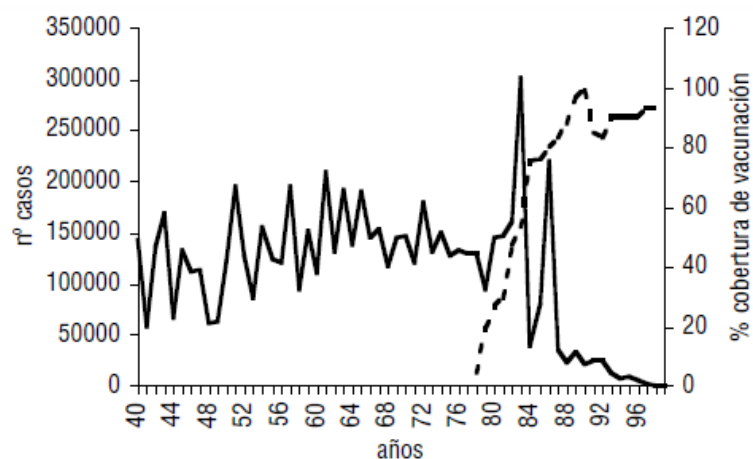
En climas templados, el sarampión es más frecuente en el invierno y principios de la primavera. La frecuencia de epidemias está determinada por el número de individuos susceptibles, la duración de la infecciosidad y los patrones de movimiento de la población. La dimensión de dicha población también supone un determinante en la edad de seroconversión. La edad media de infección es más temprana en las áreas urbanas que en las rurales tanto en países desarrollados como en desarrollo. En países en desarrollo con grandes poblaciones, las tasas de nacimiento altas conllevan infección a una edad más temprana. Los recién nacidos están protegidos del sarampión por los anticuerpos de transferencia materna, sin embargo la duración de dichos anticuerpos en el niño depende de la cantidad transferida, que es dependiente, a su vez, del nivel de anticuerpos presentes en la madre durante el embarazo.

La vacunación altera la epidemiología del sarampión reduciendo el número de individuos susceptibles en la población. En países con altas tasas de vacunación, la media de edad de contagio se incrementa puesto que la inmunidad general reduce la transmisión, e indirectamente protege a los niños. La vacunación también alarga el período interepidémico. Al producirse brotes en áreas de alta cobertura vacunal sostenida, la edad media de los casos se incrementa progresivamente, debido a que la población infantil va alcanzando un mayor nivel de inmunización. Con mayor probabilidad los brotes son locales, en contraste con las extensas epidemias

producidas en poblaciones prevacunales. Se estima que debido a la infecciosidad del MeV y su alto R_0 , se necesita una protección mayor del 95% de la población para interrumpir la transmisión. Incluso poblaciones altamente inmunizadas son vulnerables a brotes localizados asociados a casos importados desde áreas endémicas que entran en contacto con bolsas de población susceptible a la enfermedad.

En España la incidencia acumulada anual media del sarampión en la era prevacunal era de 429 por 100.000 habitantes (150.000 casos por año) hasta 1977; con una tendencia estable, ciclos bianuales y un patrón estacional primaveral. La prevención de sarampión en España (ver sección 1.8) mediante vacunación se realiza desde 1978, aunque posteriormente en 1981 se introdujo la vacuna triple vírica, que incluye sarampión, rubéola y parotiditis (SRP). Según el calendario recomendado por el Ministerio de Sanidad, se administran dos dosis de SRP: la primera entre los 12 y los 15 meses de edad y la dosis de recuerdo antes de la escolarización obligatoria entre los 3 y 6 años. Gracias a estas pautas se ha observado un descenso continuado en el nivel medio de la incidencia desde 1987, hasta los niveles alcanzados en 1999 con 244 casos notificados (0,62 por 100.000 habitantes) (Figura 1) [20].

Figura 1. Incidencia anual de sarampión en España, 1940-1999. Cobertura de vacunación contra el sarampión, 1978-1999.



Extraído del Boletín Epidemiológico Semanal, 2000, vol. 8, nº 16, pág: 169-180.

En 1998, la OMS publicó los criterios a seguir para el desarrollo de una nomenclatura uniforme de las cepas salvajes del MeV [21] que se fue actualizando en sus recomendaciones publicadas en los años 2001 [22] y 2003 [23]. Siguiendo dichos criterios, se han descrito hasta ahora 23 genotipos distintos del MeV de los que se dispone de secuencias genómicas de referencia, publicadas en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Tabla 1) [10]. Según dichas recomendaciones el fragmento mínimo de secuencia para determinar el genotipo de una cepa son 450 nucleótidos que codifican 150 aminoácidos del extremo COOH de la nucleoproteína (N). Además, para describir un nuevo genotipo es necesario obtener también un aislamiento viral y la secuencia completa del gen H que codifica la hemaglutinina viral [10].

En una determinada región, un genotipo se considera endémico si se observa su circulación durante un periodo de tiempo largo de forma más o menos continua, mientras que, si se determina circulación de distintos genotipos asociados con brotes limitados y/o casos esporádicos, es probable que sea resultado de importaciones sucesivas de virus más que de virus endémico circulante [24].

Aunque la vigilancia virológica de MeV es todavía incompleta a nivel mundial se puede tener una idea de la distribución global de genotipos (Figura 2). En países que no han interrumpido la transmisión del MeV, el genotipificado de los virus circulantes muestra el predominio de un genotipo o de un número restringido de ellos [25]. Los datos obtenidos de dicha vigilancia virológica, cuando se analizan conjuntamente con los datos epidemiológicos estándar, pueden ayudar a documentar los tipos de cadenas de transmisión y la clasificación de cada caso como vacunal, importado, endémico, etc. Asimismo, la visión conjunta de los datos también ayuda a documentar el patrón de eliminación de la transmisión endémica y por tanto proporciona los medios para medir la efectividad de los programas de control [26].

En los años anteriores a la generalización del uso de la vacuna y hasta el año 2005, no existe una información conjunta de los genotipos circulantes en Europa relacionando la aparición del mismo genotipo en distintos lugares de la Región Europea. De los documentos encontrados en bases de datos se pueden sacar apenas un par de conclusiones. Entre los años 60 y finales de los 90 se detectó el genotipo A en la antigua Checoslovaquia, Finlandia, Rusia y Dinamarca. En 2001-2002 se encuentra el genotipo A en Bielorrusia. Puesto que todas las vacunas usadas

pertenecen a este genotipo, a partir de la introducción de la vacuna es necesario el estudio de al menos la secuencia completa del gen de la hemaglutinina (H) y/o los antecedentes de vacunación para definir estos hallazgos como virus salvaje o vacunal. Durante los años 90 se detectan, aparentemente en toda Europa, dos genotipos principalmente, C2 y D6. Estos genotipos en algunos países han sido endémicos, como ocurrió en Alemania, al menos hasta el año 2000, en que se produjo un reemplazo brusco debido al genotipo D7 [27]. Entre los países en que se detecta C2 en los 90 se encuentran la República Checa (1992) [28], Dinamarca (1997) [29], Luxemburgo y Holanda durante los años 1991-1994 [30], Reino Unido en el periodo 1992-1995 [31] y España entre los años 1992 y 1994 [32]; mientras que el genotipo D6 se detectó en Reino Unido (1992-1995) [31], Rusia (1997) y Polonia (1998) [28], Turquía (1998) [33], Italia y Luxemburgo (1996-1997) [30], Dinamarca (1998) [29] y España (1994-1997) [32].

<i>Genotipo</i>	<i>Actividad^a</i>	<i>Cepa referencia</i>	<i>Acceso gen H^b</i>	<i>Acceso gen N^b</i>	<i>Nombre este trabajo</i>
A	Activo	Edmonston-wt.USA/54	U03669	U01987	AUSA54
B1	Inactivo	Yaounde.CAE/12.83 "Y-14"	AF079552	U01998	B1CAE83
B2	Activo	Libreville.GAB/84 "R-96"	AF079551	U01994	B2GAB84
B3	Activo	New York.USA/94 Ibadan.NIE/97/1	L46752 AJ239133	L46753 AJ232203	B3USA94 B3NIE97
C1	Activo	Tokyo.JPN/84/K	AY047365	AY043459	C1JPN84
C2	Activo	Maryland.USA/77 "JM" Erlangen.DEU/90 "WTF"	M81898 Z80808	M89921 X84872	C2USA77 C2DEU90
D1	Inactivo	Bristol.UNK/74 (MVP)	Z80805	D01005	D1UNK74
D2	Activo	Johannesburg.SOA/88/1	AF085198	U64582	D2SOA88
D3	Activo	Illinois.USA/89/1 "Chicago-1"	M81895	U01977	D3USA89
D4	Activo	Montreal.CAN/89	AF079554	U01976	D4CAN89
D5	Activo	Palau.BLA/93 Bangkok.THA/93/1	L46757 AF009575	L46758 AF079555	D5BLA93 D5THA93
D6	Activo	New Jersey.USA/94/1	L46749	L46750	D6USA94
D7	Activo	Victoria.AUS/16.85 Illinois.USA/50.99	AF247202 AY043461	AF243450 AY037020	D7AUS85 D7USA99
D8	Activo	Manchester.UNK/30.94	U29285	AF280803	D8UNK94
D9	Activo	Victoria.AUS/12.99	AY127853	AF481485	D9AUS99
D10	Activo	Kampala.UGA/51.00/1	AY923213	AY923185	D10UGA00
E	Inactivo	Goettingen.DEU/71 "Braxator"	Z80797	X84879	EDEU71
F	Inactivo	MVs/Madrid.SPA/94 SSPE	Z80830	X84865	FSPA94
G1	Inactivo	Berkeley.USA/83	AF079553	U01974	G1USA83
G2	Activo	Amsterdam.NET/49.97	AF171231	AF171232	G2NET97
G3	Activo	Gresik.INO/17.02	AY184218	AY184217	G3INO02
H1	Activo	Hunan.CHN/93/7	AF045201	AF045212	H1CHN93
H2	Activo	Beijing.CHN/94/1	AF045203	AF045217	H2CHN94

a: Genotipos activos son los que han sido aislados en los últimos 15 años. b: Secuencias disponibles en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Tabla 1. Cepas de referencia de genotipos de MeV definidas por la OMS en 2005.

Figura 2. Distribución de genotipos del MeV, 1995-2006. El sarampión ha sido eliminado del continente americano y Australia (no mostrados en la figura), aunque se han detectado múltiples casos importados. Extraído de Weekly Epidemiological Record, 2006, 81, p. 475.

a 100-500 casos ocurrieron en Reino Unido (B3), España (B3, D4), Alemania (D4, D6, B3), Italia (D4), Bielorrusia (D6) y Grecia (D6, D4). Los genotipos mencionados, además de B2, D5, D8, D9, H1 y G3, causaron brotes más pequeños y casos esporádicos. Por otro lado hay que destacar la ausencia de genotipos que circularon previamente, como C2 y D7, y la baja diversidad genética del genotipo D6, lo cual sugiere la interrupción de varias cadenas de transmisión del virus atribuible a un aumento en la vacunación. [43].

Durante el año 2007 se detectaron los siguientes genotipos: B3 en Italia [44]; D4 en Bélgica [45], Noruega [46], Irlanda [47] y Reino Unido [48]; D5 en Suiza [49], Alemania [50] y Rusia [51]; D6 en Polonia [52] y Rusia [51]; D8 y H1 en Rusia [51]. Finalmente, en 2008 se detectó B3 en Dinamarca [53]; D4 en Italia [54], Francia [55], Alemania [50], Dinamarca [56], Suecia [57] y Gibraltar [58]; D5 en Austria [59], Alemania [60] y Francia [55], procedente de Suiza en todos los casos; D8 en Holanda [61] y Francia [62].

Es de destacar que en el año 2008 el Reino Unido ha declarado la endemidad del MeV debido a la continuidad de la aparición de la misma cepa de genotipo D4 desde abril del año 2007 [63].

1.8 Profilaxis. Vacuna triple vírica.

En nuestro país la vacunación frente a sarampión comenzó en 1978 en niños de 9 meses de edad utilizando la cepa Schwartz, y en 1981 se introdujo la vacuna triple vírica (SRP: MeV, RUBV y parotiditis) a los 15 meses. La administración de una segunda dosis a los 11 años se inicia en 1988, y en 1999 el Sistema Nacional de Salud acuerda adelantar esta segunda dosis a los 3-6 años en base a los resultados obtenidos en la encuesta seroepidemiológica realizada en 1996 que denotaba un exceso de casos susceptibles (10%) entre los 6 y los 9 años de edad [64].

La cobertura vacunal conseguida en los años 2003-2007 gracias al calendario vacunal descrito se muestra en la Tabla 2, y en la Tabla 3 se observa el número de niños de 1 a 2 años de edad vacunados con una dosis de SRP y el de niños de entre 3 y 6 años vacunados con una segunda dosis en todas las CCAA en el año 2007.

% DE VACUNACIÓN					
	2003	2004	2005	2006	2007
Triple Vírica: Sarampión, Rubéola y Parotiditis (SRP)					
Primera dosis: niños de 12-15 meses	96,7	97,3	96,8	96,9	97,2
Segunda dosis: niños de 3-6 años	91,2	92,7	91,6	94,1	95

Ministerio de Sanidad y Consumo: <http://www.msc.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/vacunaciones/coberturas.htm>

Tabla 2. Porcentaje de coberturas de vacunación Sarampión-Rubéola-Parotiditis (SRP). Total Nacional, 2003-2007.

CC.AA	SRP-Primera dosis				SRP-Segunda dosis		
	Población	Fuente	nº dosis	%	Población	nº dosis	%
<i>Andalucía</i>	90.526	Registro nominal	87.310	96,4	87.540	84.047	96
<i>Aragón</i>	12.281	IAE	11.994	97,7	11.146	10.621	95,3
<i>Asturias</i>	7.482	INE	7.460	99,7	7.107	7.180	101
<i>Baleares</i>	10.926	IBAE	10.702	97,9	10.184	9.926	97,5
<i>Canarias</i>	20.885	ISTAC	19.971	95,6	19.797	18.920	95,6
<i>Cantabria</i>	4.986	INE	5.358	107,5	4.299	4.646	108,1
<i>Castilla y León</i>	18.865	Metabolopatías	18.398	97,5	19.266	17.323	89,9
<i>Castilla La Mancha</i>	19.724	TIS	18.678	94,7	17.653	16.562	93,8
<i>Cataluña</i>	81.163	IDESCAT	80.351	99	72.984	71.524	98
<i>C. Valenciana</i>	51.696	SIP	51.174	99	47.677	46.429	97,4
<i>Extremadura</i>	9.948	INE	9.163	92,1	10.298	10.054	97,6
<i>Galicia</i>	21.245	IGE	21.152	99,6	21.193	20.494	96,7
<i>Madrid</i>	69.485	Padrón/2006	65.593	94,4	70.027	61.162	87,3
<i>Murcia</i>	17.339	Registro nominal	17.169	99	14.875	14.307	96,2
<i>Navarra</i>	6.269	Padrón	6.123	97,7	5.683	5.308	93,4
<i>P. Vasco</i>	20.012	Metabolopatías	19.422	97,1	20.000	19.250	96,3
<i>Rioja</i>	3.026	Registro de vacunas	2.953	97,6	3.027	2.906	96
<i>Ceuta</i>	no disponible						
<i>Melilla</i>	1.156	PMH	1.138	98,4	1.128	1.038	92
TOTAL	467.014		454.109	97,2	443.884	421.697	95

Ministerio de Sanidad y Consumo: <http://www.msc.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/vacunaciones/coberturas.htm>.
 INE: Instituto Nacional de Estadística. ISTAC: Instituto Canario de Estadística. IDESCAT: Instituto de Estadística de Cataluña. IBAE: Instituto Balear de Estadística. IAE: Instituto Aragonés de Estadística. IGE: Instituto Gallego de Estadística. PMH: Padrón Municipal de Habitantes. SIP: Sistema de Información Poblacional. TIS: Tarjeta Sanitaria Individual. CRE: Centro Regional de Estadística. NOTA: Las coberturas superiores al 100% se deben a la inclusión en el numerador de niños vacunados que no están incluidos en la población objeto.

Tabla 3. Niños de 1 a 2 años de edad vacunados con una primera dosis de vacuna triple vírica (SRP) y niños de 3 a 6 años vacunados con segunda dosis. Año 2007.

1.8.1 Pautas y vías de administración.

Las vacunas disponibles contienen al menos 1000 dosis infecciosas en cultivo de tejidos (DICT) de cada uno de los tres virus. En nuestro país existen tres presentaciones: Priorix® (GlaxoSmithKline), Triviraten® (Berna) y Vacuna Triple

MSD® (Aventis Pasteur MSD). Se administra por vía subcutánea en la región externa del deltoides en un volumen de 0,5 ml una vez reconstituida la vacuna.

La primera dosis se administra a los 15 meses de edad para evitar la interferencia de anticuerpos maternos transplacentarios. No obstante, en un futuro esta edad podría adelantarse porque actualmente estos anticuerpos deben de ser menos duraderos puesto que provienen mayoritariamente de madres vacunadas, es decir, no inmunizadas de forma natural tras la enfermedad y que, además, no hacen respuestas secundarias después de la vacunación por no verse expuestas a virus circulante. De hecho, en Cataluña ya se adelantó la primera dosis a los 12 meses al comprobarse que en brotes de más de 50 casos el número de menores de 15 meses afectados por la enfermedad se incrementaba.

En casos de retraso o inmunización incompleta se ha propuesto un calendario acelerado que consiste en la administración de dos dosis de SRP separadas por un mes en el supuesto de que el niño no haya recibido ninguna dosis, o una única dosis si el niño ha sido vacunado anteriormente, siempre con un mes de diferencia entre ellas [65].

Si un niño no vacunado se expone al virus del sarampión se le vacunará en las 72 horas siguientes, siendo posible prevenir la clínica derivada de la infección. En casos en que la vacunación esté contraindicada se puede administrar inmunoglobulina en los 3-5 días desde la exposición, aunque no es una práctica habitual. Se recomienda la vacunación en niños infectados con VIH e incluso en los enfermos de SIDA asintomáticos, aunque la respuesta inmunitaria sea menor que en los niños sanos; por eso, si se exponen al virus, se administrará inmunoglobulina específica. Por otro lado, la vacuna está indicada en los pacientes con leucemia en remisión que lleven más de 3 meses sin tratamiento oncológico.

La administración de inmunoglobulinas u otros productos sanguíneos que contengan anticuerpos puede interferir con la respuesta inmune a la vacuna. Por ello la vacunación debe retrasarse 3-11 meses después de la administración de sangre o productos sanguíneos, dependiendo de la dosis de anticuerpos de sarampión. Después de la vacunación frente a sarampión la administración de dichos productos sanguíneos debe evitarse durante 2 semanas, si es posible [66].

La hiperatenuación de los virus contenidos en la vacuna hace que éstos sean muy lábiles a la luz y el calor. La vacuna reconstituida pierde el 50% del potencial del

componente sarampión después de una hora a una temperatura de 20°C y casi todo su potencial después de una hora a 37°C. El vial del liofilizado con la mezcla de virus debe conservarse entre 4 y 8°C [66, 67].

1.8.2 Contraindicaciones.

La vacuna SRP está contraindicada en el embarazo por la teórica posibilidad de afectación fetal por virus de la rubéola y debe desaconsejarse el embarazo durante los 3 meses siguientes a la fecha de la vacunación. También debe posponerse cuando haya fiebre elevada, aunque los cuadros febriles leves de vías respiratorias altas no suponen una contraindicación. La tuberculosis activa es una contraindicación por la inmunosupresión vacunal inducida por el virus del sarampión. Una contraindicación absoluta es la alergia grave a los componentes de la vacuna. Si existe alergia al huevo se puede vacunar bajo vigilancia hospitalaria. Si se ha administrado inmunoglobulina humana recientemente se puede inhibir la multiplicación vírica y resultar ineficaz la vacunación, por ello debe retrasarse [66, 67].

1.8.3 Efectos secundarios.

Generalmente son efectos moderados y transitorios. En la SRP son debidos a los efectos de cada uno de sus componentes. El componente de sarampión puede producir:

- Reacciones sistémicas, como erupción en $\approx 2\%$ de los vacunados y fiebre superior a 39°C entre los 5 y 12 días desde la administración y de forma autolimitada (1-2 días).
- Reacciones locales que se producen en las primeras 24 horas, como calor, enrojecimiento, tumefacción o linfadenopatía local.
- Reacciones infrecuentes, como trombocitopenia en las 2 ó 3 semanas siguientes a la vacunación con una incidencia de 1/30-40.000 vacunados o 1/100.000-1.000.000 de dosis; o como encefalitis en los 30 días siguientes en 1/1.000.000 de vacunas administradas. La virtual desaparición de PEES en países donde el sarampión ha sido eliminado, sugiere que la vacuna previene la aparición de PEES al prevenir la infección por MeV.

Es necesario mencionar que varios estudios cuidadosamente realizados han sido incapaces de confirmar informes anteriores que sugerían una asociación entre la recepción de vacuna de sarampión viva atenuada o de SRP, y la aparición de autismo o inflamación intestinal crónica [66].

El componente rubeólico puede dar lugar a fiebre, linfadenopatías, exantema y artralgias, esto último sobre todo en 10-25% de mujeres en edad fértil. Se han descrito casos de trombopenia transitoria, sin púrpura.

Finalmente, en lo que se refiere al componente parotídico los efectos secundarios son raros. La frecuencia de complicaciones en el SNC ha sido menor que la incidencia observada en la población no inmunizada. La orquitis, reacciones alérgicas y parotiditis son raras [66, 67].

1.8.4 Futuro de la vacuna triple vírica.

En septiembre del 2005, la "Food and Drugs Administration" (FDA) aprobó la vacuna combinada tetravalente (SRPV) para prevenir el sarampión, la parotiditis, la rubéola y la varicela administrándola a niños de 12 meses a 12 años de edad. Esta vacuna podía ser usada en lugar de la vacuna triple vírica. La pauta vacunal recomendada es de 2 dosis, la primera a los 12-15 meses de edad y la segunda a los 4-6 años.

En los estudios previos a la comercialización de la vacuna SRPV, ésta se asociaba a una mayor incidencia de fiebre entre los 5 a 42 días de su administración, que cuando se administraban por separado la vacuna de la varicela y la SRP, incluso aunque se hiciese en la misma visita. Debido a la conocida asociación entre fiebre y convulsiones febriles [68] el CDC instó a la compañía Merck a realizar estudios postcomercialización que descartaran la posible asociación entre la vacuna SRPV y un incremento de las convulsiones febriles.

El 27 de febrero del 2008 ha sido presentada una nueva información al "Advisory Committee on Immunization Practices" (ACIP) acerca del mayor riesgo de convulsiones febriles en niños de 12-23 meses de edad que recibieron la vacuna SRPV (ProQuad®, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, New Jersey). Esta información fue presentada por el "Kaiser Permanent Vaccine Study Center" y el "Vaccine Safety Datalink" y ha llevado al ACIP a cambiar sus recomendaciones acerca de la vacuna. Así, si antes se abogaba por la introducción de la vacuna combinada SRPV, ahora se aconseja la administración de la vacuna SRP y varicela por separado.

Esta nueva recomendación se ha publicado el 14 de marzo de 2008 en el Morbidity and Mortality Weekly Report [69].

2. CONTROL DEL SARAMPIÓN

El sarampión sigue siendo una causa importante de muerte infantil en el mundo, sobre todo en países en desarrollo. En regiones con un plan de eliminación ya establecido, la OMS y UNICEF tienen como objetivo conseguir y mantener la interrupción de la transmisión de cepas salvajes de MeV. Por otro lado, en 47 países, prioritarios porque presentan la mortalidad más alta, dichos organismos implantaron una estrategia de "Reducción de la Mortalidad por Sarampión, 2001-2005". Dicha estrategia incluía conseguir una alta cobertura vacunal de rutina (>90%), proporcionar una segunda oportunidad de vacunación frente al virus, mejorar la vigilancia de la enfermedad y mejorar el manejo de cada caso incluyendo suplementos de vitamina A y uso de antibióticos si fuera necesario.

Gracias a este planteamiento, la cobertura global con la primera dosis de vacuna aumentó desde 71% en 1999 a 83% en 2008, aunque con variaciones significativas según el área geográfica. África y el Sureste de Asia son las regiones donde se ha producido el mayor incremento en la cobertura de rutina entre los años 1999 y 2008, de 49 a 73% y de 54 a 75% respectivamente. Además, se ha aumentado la proporción de países que ofrecen una segunda oportunidad de vacunación a niños a través de Actividades de Inmunización Suplementarias (AIS) o de vacunación rutinaria. Durante 2004 ciento sesenta y ocho países ofrecieron una segunda dosis de vacuna comparado con los 150 del año 2001. En 2007, veinte de los 47 países prioritarios llevaron a cabo AIS, alcanzando aproximadamente a 91 millones de niños. En 2008 fueron 16 los países prioritarios que llevaron a cabo AIS alcanzando en este año aproximadamente a 109 millones de niños y adolescentes [70, 71].

En 2008, 173 (90%) de los 193 estados miembros de la OMS habían implementado la vigilancia basada en cada caso, comparado con los 120 (62%) países que la habían implementado en 2004, que fue el primer año del que se obtuvo este dato.

La mortalidad global debida a sarampión disminuyó un 78%, de 757000 muertes estimadas en 2000 a 164000 en 2008. La mayor reducción en el porcentaje por regiones en la mortalidad estimada debida a sarampión durante 2000-2008 ocurrió

en las Regiones del Mediterráneo Oriental (93%) y de África (92%), lo cual supone el 17% y 60% de la reducción global respectivamente [71, 72].

Cuando la incidencia de sarampión y rubéola es baja, como ocurre en muchos países desarrollados o con un avanzado programa de control o eliminación, es necesaria una vigilancia de los casos individuales basada en el diagnóstico de laboratorio, utilizando la detección de IgM de forma complementaria con el genotipificado de las cepas de virus circulantes. LabNet, grupo global de laboratorios de sarampión y rubéola de la OMS, se formó en 2003 para proporcionar pruebas estandarizadas para la detección de ambos virus, una estructura informativa y un programa global de garantía de calidad de los laboratorios [26]. La ausencia de confirmación por el laboratorio de los casos de MeV podría causar una sobreestimación de la incidencia especialmente en países con casos esporádicos o escasos, porque la baja incidencia de la enfermedad da como resultado un pobre valor predictivo positivo del diagnóstico clínico de sarampión [73].

En lo que respecta a la Región Europea de la OMS, en 2002 se desarrolló e implantó el *Plan estratégico para sarampión e infección congénita por rubéola*, que propone la interrupción de la transmisión de MeV salvaje y la reducción de la incidencia del síndrome de rubéola congénita (SRC) a <1/100.000 nacidos vivos para el año 2010. Posteriormente, en 2004 los responsables nacionales de los programas de inmunización de la Región Europea y el grupo técnico de expertos en inmunización, asesor de la OMS (WHO European Technical Advisory Group of Experts on Immunization; ETAGE) revisaron los objetivos del plan y recomendaron la inclusión de la eliminación de la rubéola en la estrategia [74].

Las claves de la estrategia para alcanzar los objetivos de eliminación del sarampión y de la rubéola en la Región Europea recogidas en el plan estratégico de la OMS para 2005-2010 son:

- a. Alcanzar y mantener coberturas de vacunación $\geq 95\%$ con 2 dosis de vacuna que contenga MeV y al menos con 1 dosis de vacuna que contenga RUBV de forma rutinaria, prestando especial atención a poblaciones de riesgo con bajas coberturas.
- b. Ofrecer una segunda oportunidad mediante recaptación de susceptibles a sarampión por medio de AIS.

- c. Ofrecer la vacuna de la rubéola a personas susceptibles (mujeres en edad fértil, niños y adolescentes).
- d. Implementar una vigilancia de calidad frente a sarampión, rubéola y SRC basada en cada caso, investigando de forma rigurosa cada caso sospechoso con confirmación de laboratorio.
- e. Mejorar la difusión de información a los profesionales sanitarios y al público en general [74, 75].

En 2004, 52 de los 53 países que forman la Región Europea de la OMS tenían en sus calendarios vacunales 2 dosis de vacuna de MeV, comparado con 49 países en 2001, resultando una cobertura regional total del 94% para la primera dosis. Además, durante el período 1990-2004 más de 27,7 millones de personas fueron vacunadas gracias a AIS. Como consecuencia, la incidencia de sarampión disminuyó rápidamente entre 1990 y 2003; siendo en 2003 de 3,2/100.000, lo cual correlaciona bien con el lento incremento de la cobertura vacunal de MeV ocurrido entre 1990 y 2001, y a pesar de que la cobertura disminuyó ligeramente entre 2002 y 2003. En 2006, sólo un 45% de países informaron una incidencia igual o menor a 1/1.000.000 mientras que 9 países informaron de una incidencia superior a 1/100.000. Este incremento con respecto a años anteriores se debe a distintos brotes epidémicos ocurridos en varios países miembros de la Región Europea [43, 76].

En 2008 la cobertura para la primera dosis fue del 94%, mientras que para la segunda el rango se hallaba entre el 66% y el 99% (Figura 3). Aunque la incidencia total en la Región disminuyó a niveles bajos (≤ 10 casos por millón de habitantes), se ha detectado un aumento de casos de sarampión en los países más occidentales de Europa debido a la existencia de bolsas de personas susceptibles a causa de una cobertura vacunal por debajo de la óptima. Así, el 92% de casos informados ocurrieron en Austria, Francia, Alemania, Italia, España, Suiza y Reino Unido. En este año el número de países que informaron de una incidencia de sarampión < 1 por millón de habitantes fue 29 de 52 países (55%) [77] y en 2004 catorce países (27%) informaron de una incidencia de rubéola similar [78].

Figura 3. Cobertura de la vacuna de MeV en la Región Europea de la OMS, 2008 (primera y segunda dosis). Extraído de Organización Mundial de la Salud, 2009.



En España el sarampión es una enfermedad de declaración obligatoria desde el año 1901. A partir de 1997, con la entrada en vigor de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RNVE), se mantuvo la notificación numérica y semanal de caso sospechoso de sarampión y, además, se requirió el envío de un informe anual en el que constaban todos los casos notificados. En el año 2000, de acuerdo con las recomendaciones establecidas por la OMS, se propusieron en España los objetivos de eliminar la morbilidad y mortalidad del sarampión y eliminar el sarampión autóctono para el año 2005. Para conseguirlo se pretendía reducir para el año 2000 en cada grupo de edad la proporción de personas susceptibles a los niveles recomendados por la OMS (5-10% en cada cohorte de edad); mantener los niveles bajos de susceptibilidad hasta la eliminación mundial; intensificar el sistema de vigilancia epidemiológica; reforzar el papel del laboratorio en la vigilancia del sarampión y definir las estrategias de vacunación que acelerarían el control de la infección. En base a estas directrices se establecieron definiciones de caso sospechoso de sarampión, caso confirmado por laboratorio, caso compatible o confirmado clínicamente, caso descartado y caso importado. También se establecieron las normas de recogida de muestras clínicas para la confirmación del agente etiológico

por el laboratorio, de evaluación del sistema de vigilancia y de difusión de la información [20].

En el año 2003, a la vista de la situación del sarampión en los países europeos, España, siguiendo las instrucciones de la OMS, amplió el plazo de eliminación del sarampión e incorporó un objetivo complementario de control de la rubéola congénita, ambos para el año 2010. Según los criterios de eliminación del sarampión de la OMS, después de cuatro años de Plan de Eliminación (2001-2004), en España se ha alcanzado el objetivo de eliminación del sarampión puesto que la incidencia es menor de 1 caso por 1.000.000 de habitantes; se detectan casos importados aislados, con brotes de pequeño tamaño y pocas generaciones de casos secundarios; los casos aislados se dan en poblaciones con transmisión interrumpida durante tiempo o en poblaciones de gran afluencia turística que dificulta la investigación de la fuente; las estimaciones del número reproductivo básico R_0 son menores de uno y los genotipos identificados presentan amplia variabilidad [79]. Sin embargo, mientras no se elimine la circulación del sarampión en el mundo existe la posibilidad de que se sigan presentando brotes de distinta intensidad a partir de la importación de casos, que afectarán a la población susceptible, colectivos de riesgo potencial (inmigrantes, etnia gitana, detractores de la vacuna) y a las cohortes con menores coberturas. En el año 2004 se incluyó entre los objetivos del plan la eliminación de la rubéola para el año 2010.

Después de la introducción de la vacuna frente a sarampión en el año 1978, y la de la vacuna SRP en 1981, se observa en España, desde el año 1987, un descenso continuado en el nivel medio de la incidencia hasta los niveles alcanzados en 1999 con 244 casos notificados (0,62 por 100.000 habitantes) [20]. La cobertura de vacunación aumentó lentamente, en 1986 era mayor del 80% y desde 1991 se mantiene por encima del 90% [80]. En el año 2000 se notificaron 158 casos (incidencia anual de 0,4 por 100.000) y la cobertura vacunal fue superior al 95% en todas las Comunidades Autónomas (CCAA). Los casos sospechosos, confirmados, compatibles y la incidencia de los años 2001-2008 se detallan en la Tabla 4, modificada de Martínez de Aragón y Esquivias et al [79].

<i>Año</i>	<i>Total sospechosos</i>	<i>Confirmados (% del total sospechas)</i>	<i>Compatibles (% total sospechas)</i>	<i>Incidencia (Confirmados y compatibles) x 100.000 habitantes</i>
2001 Casos	136	36	17	0.13
%	100%	26%	13%	
2002 Casos	212	64	15	0.16
%	100%	30%	7%	
2003 Casos	518	243	12	0.62
%	100%	47%	2%	
2004 Casos	120	25	1	0.06
%	100%	21%	1%	
2005 Casos	100	20	2	0.05
%	100%	20%	2%	
2006 Casos	545	362	15	0.83
%	100%	66%	3%	
2007 Casos	483	255	12	0.59
%	100%	53%	2%	
2008 Casos	474	297	69	0.67
%	100%	63%	15%	

Tabla 4. Incidencia de sarampión en España, 2001-2008.

Es de destacar un claro desplazamiento de la edad de los casos hacia menores de 15 meses y adultos entre 20 y 29 años nacidos antes de que se lograran coberturas vacunales altas tras la universalización de la vacunación. Además también se ha podido apreciar en los últimos años la transmisión en el ámbito hospitalario durante el transcurso de distintos brotes [79].

Pese a todo, la situación actual en nuestro país ha cambiado ligeramente puesto que la incidencia ha estado cercana a 1 por 100.000 habitantes en tres años consecutivos. A diferencia de otros años, en 2008 un 24% de los casos se produjeron en edades (4-19 años) que no deberían haber presentado casos por estar adecuadamente vacunados, lo que podría estar reflejando una disminución en la cobertura vacunal en los años correspondientes de vacunación de los afectados. También, a diferencia de años anteriores, se puso de manifiesto un aumento de la enfermedad en varones, en todos los grupos de edad.

A la vista de los datos de los últimos años, el sarampión parece haber pasado de ser una enfermedad infantil a una de adultos jóvenes, lo cual, a su vez explica la creciente afectación de personal sanitario durante los brotes. Por esta razón deberían de plantearse cambios en la difusión de los protocolos de actuación, haciendo especial hincapié en la atención primaria de adultos y en las urgencias hospitalarias, y no solo en pediatría y sus urgencias. Además, se hace necesario una sensibilización de los servicios de medicina preventiva de los centros de atención sanitaria a fin de mejorar la prevención de la enfermedad entre el personal asistencial.

En consecuencia con todo lo dicho en este apartado, la consecución del objetivo de eliminación del sarampión para el año 2010 en la región europea parece algo más complicada de alcanzar de lo que se preveía hace unos años [81].

3. OTROS VIRUS PRODUCTORES DE EXANTEMA

3.1 Virus de la rubéola.

El virus de la rubéola (RUBV) pertenece al género *Rubivirus* de la familia *Togaviridae* [82]. En el microscopio electrónico se muestra como partículas esféricas de 60 a 70 nm de diámetro formadas por una nucleocápsida icosaédrica de 32 capsómeros y una envuelta lipídica derivada de la célula huésped. En su interior, unido a la proteína C de la cápsida, se localiza un genoma de ARN de polaridad positiva de 10 a 12 kb. Finalmente, se aprecian dos glicoproteínas de 5 a 8 nm de longitud, denominadas E1 y E2, que emergen de la envuelta.

El rango de huéspedes de RUBV se restringe *in vivo* solo a humanos; aunque *in vitro* se puede replicar en una amplia variedad de células, como por ejemplo, células primarias AGMK (células de riñón de mono verde africano) y líneas celulares como BHK21 (fibroblastos de riñón de hámster sirio), RK13 (monocapa epitelial de riñón de conejo) o Vero.

Hasta un 50% de casos de infección por este virus son asintomáticos, un factor muy importante para el manejo de los brotes por RUBV [83]. La infección se adquiere vía inhalación de aerosol y la entrada del virus en las células de la mucosa del tracto respiratorio superior se produce por endocitosis mediada por receptor, mientras que, los sitios esenciales de replicación son tanto el tejido linfoide nasofaríngeo como el

del tracto respiratorio superior. Después de la infección de los nódulos linfáticos se origina una viremia que conlleva una infección sistémica, implicando a muchos órganos, entre ellos, la placenta. Después de un período de incubación de 18 días de media (de 12 a 23 días aproximadamente), el virus se detecta en suero, y comienza la secreción en nasofaringe, la cual puede continuar durante 1 a 2 semanas, o incluso más. También puede recuperarse el virus de la nasofaringe durante una semana antes del comienzo del exantema. La fase virémica puede venir marcada por síntomas prodrómicos moderados y malestar. El exantema maculopapular comienza 14 a 21 días después de la exposición al virus. La presencia de virus en suero cesa poco después de la aparición del exantema, al mismo tiempo que empiezan a detectarse anticuerpos específicos circulantes. Sin embargo, en secreciones nasofaríngeas y orina se puede detectar el virus durante una semana o más después de que el exantema desaparezca.

3.1.1 Manifestaciones clínicas.

Rubéola aguda. La infección en niños o adultos es normalmente moderada, con la mayoría de casos subclínicos o, lo que es más interesante, no diagnosticados como rubéola. La enfermedad se caracteriza por exantema maculopapular, linfadenopatía, fiebre baja, conjuntivitis, garganta irritada y artralgia. El exantema se inicia primero en la cara y, posteriormente, se extiende al tronco y extremidades. Las lesiones aparecen como maculópápulas de color rosa dispersas que luego confluyen y tardan varios días en desaparecer. Las adenopatías suboccipital y cervical posterior también son características. El síndrome clínico desaparece rápidamente en días y, ocasionalmente, puede producir artropatía, trombocitopenia y encefalopatía.

Los anticuerpos IgM se detectan 10 días después de la infección en la primoinfección aguda, alcanzando un nivel máximo en la cuarta semana post-infección y persistiendo durante 7 meses, aunque se han detectado hasta 12 meses después. La respuesta de anticuerpos IgG es más tardía y aumenta progresivamente hasta alcanzar un nivel estable durante toda la vida del individuo.

Complicaciones. La rubéola puede complicarse con artralgia aguda o artritis, y cuando lo hace de esta forma es principalmente cuando la infección natural ocurre en mujeres adolescentes o adultas.

Otra complicación habitual es la trombocitopenia asintomática transitoria, aunque la púrpura trombocitopénica sintomática sólo se produce en 1 de 1500 casos. En muy pocas ocasiones se ha asociado rubéola epidémica con anemia hemolítica. También son esporádicos los casos publicados de arritmia cardíaca en rubéola infantil aguda y de tiroiditis y disfunción hepática en adultos con rubéola.

La complicación más seria de la rubéola postnatal es la encefalopatía postinfecciosa o encefalomielitis. Se estima que ocurre en uno de cada 6000 casos. No se han encontrado evidencias de la implicación directa del virus en la patogénesis de esta encefalopatía, pero sí se han detectado antígenos de RUBV *in situ* en tejido cerebral y se ha aislado el virus en una muestra de LCR, indicando la capacidad que tiene el RUBV de invadir el SNC. Un 80% de los pacientes se recupera espontáneamente.

Síndrome de rubéola congénita (SRC). La infección materna por RUBV poco antes de la concepción no parece provocar infección intrauterina. No obstante, durante las 8 primeras semanas de gestación la transmisión transplacentaria se produce en hasta un 90% de casos, disminuyendo durante el segundo trimestre a un 25-35% y aumentando de nuevo al final del embarazo. La infección en una fase muy temprana del embarazo provoca reabsorción del embrión. En fases posteriores, aumenta la posibilidad de supervivencia del feto, aunque también se producen partos prematuros o muertes de recién nacidos a término. La mayoría de los niños con SRC (80%) tienen afectación neurológica, pudiendo aislarse virus en el LCR de un 30 % de los casos. Por otro lado, se puede aislar RUBV de casi cualquier órgano en el momento del nacimiento, y en algunos tejidos durante el primer año o más después del nacimiento.

Enfermedad neurológica retardada. Una complicación inusual es la panencefalitis progresiva por rubéola (PPR), la cual se caracteriza por un período asintomático prolongado, seguido de síntomas de deterioro neuronal durante la segunda década de la vida. Se producen asimismo, cambios del comportamiento, deterioro intelectual, ataxia, espasticidad y, a veces, convulsiones. La muerte se produce en aproximadamente 8 años. Aunque esta enfermedad se asocia más a menudo con SRC en niños y jóvenes, también puede ser una complicación muy rara de la rubéola aguda en niños [84].

3.1.2 Epidemiología y control.

Son escasas las estadísticas fiables sobre tasas de incidencia de SRC en países en desarrollo, sin embargo, antes de la introducción de la vacuna frente a RUBV las tasas de incidencia variaban entre 0,1-0,2 por 1000 nacidos vivos en periodos endémicos; mientras que en periodos epidémicos variaba entre 1 y 4 por 1000 nacidos vivos sin que existieran grandes diferencias entre países industrializados y países en desarrollo [85].

La vigilancia epidemiológica impulsada por la OMS desde 1996 en países en desarrollo evidenció una tasa de incidencia de SRC entre 0,4 y 4,3 por 1000 nacidos vivos. Esta incidencia es comparable, o incluso mayor en algunos casos, a la encontrada en países industrializados en la era prevacunal [86].

En EEUU y Europa la vacuna se autorizó en 1969, y actualmente se aconseja incluirla en la agenda infantil de inmunizaciones sólo si se puede mantener una cobertura >80% a largo plazo, debido a que una cobertura inadecuada provocaría un riesgo de alterar la dinámica de transmisión de la enfermedad comportando un aumento en la susceptibilidad de mujeres en edad fértil, con el potencial aumento en los casos de SRC [85].

Las recomendaciones de la OMS para la vigilancia de SRC y rubéola incluyen la definición de caso y algoritmos para la investigación de los casos sospechosos [87]. En 2004, dicha organización estableció la nomenclatura para describir las características de los RUBV salvajes y recomendó una región del gen E1 de 739 nucleótidos (nucleótidos 8731 al 9469 del genoma completo) para el análisis molecular de rutina. En base a esa región se han designado dos grupos filogenéticos denominados 1 y 2, los cuales difieren en un 8-10% en sus nucleótidos [88]. En 2007 se publicó una actualización de los genotipos estableciéndose 9 reconocidos (1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G, 2A, 2B y 2C) y 4 provisionales (1a, 1h, 1i y 1j) [89].

El Comité Regional de la OMS para Europa aprobó en 2005 el *Plan Estratégico 2005-2010: Eliminación del Sarampión y de la Rubéola y Prevención de la IRC en 2010*, con el cual se establecieron los objetivos de mantener una incidencia de sarampión y rubéola menor de 1 caso por 100.000 habitantes y una incidencia de SRC menor de 1 caso por 100.000 nacidos vivos. Con respecto a la vacunación frente a RUBV, en el año 2006, 51 de los 53 países de la Región Europea de la OMS usaban una vacuna que contenía RUBV frente a los 39 que lo hacían en el año 2001 [75, 90].

Aún así, la incidencia de rubéola sigue siendo alta en la Región Europea, con períodos cortos interepidémicos. Durante el período 2001-2003 por ejemplo, se informaron 47 casos de SRC, 17 de ellos en un solo país, Rumania, que experimentó un gran brote de rubéola en 2003 [75].

En España, la introducción de los programas de vacunación ha supuesto una disminución progresiva de la incidencia de la rubéola, paralela a la observada en el caso de sarampión, pasando de 9,63 casos por 100.000 habitantes en 1997 a 0,15 en el año 2007. Las tasas de incidencia de los últimos cinco años indican escasa circulación del virus, con la aparición de algunos brotes localizados en algunas Comunidades Autónomas, que han afectado principalmente a adultos jóvenes en población inmigrante de ambos sexos y a varones adultos españoles no cubiertos por los programas de vacunación y que hicieron que la tasa del año 2005 sobrepasara el 1 por 100.000, concretamente 1,34 por 100.000. Durante el año 2007 todas las CCAA, excepto Ceuta (1,31) y las Islas Canarias (1,14), presentaron tasas inferiores a 1 por 100.000. Respecto al SRC, desde la implantación de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica en 1997 hasta 2005, se han notificado trece casos, cuatro de los cuales están asociados a un brote de rubéola ocurrido en Madrid en el año 2005. La incidencia media anual es <1 caso por 100.000 nacidos vivos, excepto en el año 2005 que fue de 1,09 por 100.000 [91].

3.1.3 Diagnóstico.

Es preciso destacar que la rubéola se puede confundir con otras enfermedades asociadas a exantema maculopapular. Por ello el diagnóstico diferencial debe hacerse con sarampión, escarlatina, exantema súbito, eritema infeccioso y exantema asociado a infecciones por algunos enterovirus o adenovirus. Además, en áreas endémicas el diagnóstico diferencial se debe establecer con virus dengue, Sindbis, Chikungunya y Ross River [92].

El diagnóstico de la rubéola aguda se realiza por serología mediante detección de IgM específica por técnica de ELISA, que se puede detectar desde la aparición de los síntomas hasta 6 u 8 semanas después de que desaparezcan. Los resultados falsos positivos son más probables si se usa la técnica de ELISA indirecto que la de captura y pueden producirse también por reacción cruzada con otras IgM o por presencia de factor reumatoide. Por tanto, se debe realizar un segundo test de distinto formato

para confirmar un resultado positivo sobre todo en pacientes embarazadas. También puede detectarse por técnica de ELISA aumento de anticuerpos IgG desde los 4-7 días desde el comienzo de los síntomas, aunque a veces la respuesta se retrasa [93]. Además, la medición de la avidéz de IgG específica de RUBV es una alternativa para el diagnóstico de infección reciente, ya que en éstas suele ser baja y es la base de la confirmación de los resultados positivos a IgM. Durante la infección aguda, el virus se puede aislar de secreciones nasofaríngeas durante 6 días antes y después de la aparición del exantema, así como de orina. La detección del ARN vírico por RT-PCR en estas mismas muestras es más sensible que el cultivo y aumenta el período de tiempo en el que el virus es detectable [94].

La confirmación del diagnóstico de rubéola congénita requiere aislamiento del virus o evidencia serológica de infección aguda en el niño. En ausencia de confirmación por el laboratorio, un diagnóstico clínico compatible con SRC requiere la presencia de al menos dos de los siguientes síntomas: cataratas o glaucoma congénito, enfermedad cardíaca congénita, pérdida auditiva, o retinopatía pigmentaria.

El diagnóstico de laboratorio en niños infectados en el útero incluye la detección de IgG e IgM después del nacimiento. Sin embargo, al presentar también IgG específica materna, el diagnóstico de laboratorio de SRC suele hacerse por detección de IgM. Ésta se detecta en casi el 100% de casos desde el nacimiento hasta los tres meses de edad. Luego la respuesta disminuye progresivamente a menos del 50% a los doce meses y, ocasionalmente, se detecta después de los 18 meses [93]. La infección se puede confirmar a veces por aislamiento del virus en sangre del cordón umbilical o tejido de la placenta. Además, el virus puede aislarse de secreciones nasofaríngeas en un 80-90% de neonatos con SRC durante el primer mes de vida disminuyendo progresivamente en el primer año. También se aísla de orina y LCR.

La detección de genomas por RT-PCR mejora la sensibilidad del diagnóstico directo, además, se ha aplicado al diagnóstico *in utero* en muestras de amniocentesis, cordocentesis o vello coriónico. La técnica es específica y sensible y proporciona resultados más rápidamente que el aislamiento [84].

3.2 Parvovirus B19.

La familia *Parvoviridae* se divide en dos subfamilias en relación a la capacidad de producir infección en vertebrados o invertebrados, *Parvovirinae* y *Densovirinae* respectivamente. A su vez, *Parvovirinae* comprende cinco géneros: *Parvovirus*, *Dependovirus*, *Erythrovirus*, al cual pertenece B19V, *Amdovirus* y *Bocavirus* [95, 96].

Los *Erythrovirus* son virus pequeños, sin envoltura, con una cápsida de simetría icosaédrica formada por dos proteínas, VP1 y VP2, que encapsidan un número equivalente de cadenas de ADN linear monocatenario de sentido negativo y de sentido positivo, de 5,6 kb (5596 nt) [97].

El B19V tiene predilección por células eritroides humanas. Sus células diana son las progenitoras eritroides, y la célula madre no se afecta, es decir, se reproducen en células que se dividen rápidamente [95].

La principal ruta de transmisión es probablemente a través del aparato respiratorio superior, aunque también se excreta por orina. La infección intrauterina, otra de sus vías de transmisión, produce frecuentemente pérdida fetal. También se puede adquirir por medio de hemoderivados o tejidos contaminados. Los principales lugares de multiplicación del virus son la médula ósea en el adulto y el hígado en el feto. Aunque la replicación del virus en adultos solo se ha documentado en médula ósea, el ADN del virus puede detectarse en cualquier tejido perfundido por sangre. Durante la infección, el B19V puede detectarse en suero en el quinto y sexto día, y los mayores niveles se encuentran 8 ó 9 días después en el caso de inoculación intranasal. La viremia se acompaña de síntomas no específicos que son similares a los de la gripe. La aplasia de células rojas causada por la multiplicación en médula ósea coincide con la viremia. Los pacientes con crisis aplásica transitoria desarrollan los síntomas precozmente en el curso de la infección. La aparición de IgM e IgG específicas a los 10 a 14 días de la infección se acompaña de los síntomas clásicos de la denominada quinta enfermedad, es decir, erupción eritematosa e inflamación de las articulaciones. Las manifestaciones clínicas coinciden con la formación de inmunocomplejos circulantes que juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad [97].

3.2.1 Manifestaciones clínicas.

Eritema infeccioso y artropatía. En torno a un 25% de infecciones por B19V son asintomáticas, y hasta un 50% no presentan exantema, el síntoma más obvio. La infección aguda causa eritema infeccioso o quinta enfermedad de la infancia. Se trata de un eritema característico en "cara abofeteada" y una erupción maculopapular reticulada en tronco y extremidades. Esta enfermedad se puede confundir con otros exantemas infantiles [97].

Aproximadamente un 50% de casos de eritema infeccioso en adultos se han asociado con manifestaciones articulares que persisten durante 1 mes, en lugar de con exantema. Sin embargo, alrededor de un 20% de mujeres afectadas sufren artropatía persistente o recurrente. Este síndrome, que puede durar semanas, meses o años, es, probablemente, una consecuencia de la respuesta inmune del hospedador. También se ha propuesto al B19V como el agente causante de artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil y poliartritis erosiva, ya que se ha detectado infección reciente por B19V y altos niveles de anticuerpos frente al mismo en muchos de estos pacientes [98]. Sin embargo ésta es una asociación controvertida, pues también se ha encontrado ADN del virus en líquido sinovial de individuos sanos [99-101].

El hallazgo reciente de ADN de B19V en un 64% de biopsias de piel en un grupo control, comparado con el 50% encontrado en pacientes con urticaria confirma que no se pueden obtener conclusiones precipitadas sobre la implicación de este virus en distintos desórdenes cutáneos [98].

Después de la infección por B19V, natural o experimental, se producen inmunoglobulinas tipo M y G. La IgM frente a epítomos lineales o conformacionales de VP1 y VP2 aparece entre 10 y 12 días después de la infección y puede encontrarse en suero hasta 5 meses después, aunque en algunos pacientes puede durar más incluso. La IgG aparece sobre 2 semanas después de la inoculación y probablemente persiste a lo largo de toda la vida. Se pueden detectar también anticuerpos IgA y presumiblemente juegan un papel en la protección contra la infección vía nasofaringe [97, 102].

Anemia aplásica transitoria y desórdenes hematológicos. En pacientes con desórdenes hematológicos subyacentes la infección aguda por B19V causa crisis aplásica transitoria, un abrupto cese de la producción de células rojas

caracterizado por reticulocitopenia, ausencia de precursores eritroides en la médula, viremia masiva y un empeoramiento de la anemia. Es una situación autolimitada, sin embargo, el paciente puede presentar enfermedad aguda con síntomas de anemia grave. La resolución de la crisis ocurre entre 7 y 10 días después del comienzo, concomitantemente con la aparición de anticuerpos antivíricos y el aclaramiento del virus [97].

Infección fetal e hidropesía fetal. Se ha asociado la infección por B19V con la pérdida fetal en la embarazada. La mayor mortalidad corresponde a aquellos casos en los que la madre se infectó en el primer trimestre de la gestación. La infección en el segundo trimestre se asocia predominantemente a hidropesía fetal. La infección en el tercer trimestre solo supone riesgo para el feto de forma muy excepcional. Conviene destacar que no todos los casos de hidropesía conducen a la pérdida fetal. La infección cuando no desemboca en muerte del feto puede persistir después del nacimiento como aplasia pura de células rojas [97].

Infección persistente. Muchos pacientes con infección persistente por B19V sufren anemia pura de células rojas o anemia crónica. La infección persistente se ha asociado con una amplia variedad de desórdenes inmunes adquiridos y congénitos [103].

3.2.2 Epidemiología.

La infección por B19 tiene una distribución mundial y su presentación puede ser tanto epidémica como esporádica. La seroprevalencia aumenta con la edad y la población adulta es seropositiva en más del 70% de casos [98]. Los patrones de seroprevalencia son generalmente similares en distintos países. Tanto el eritema infeccioso como la crisis aplásica transitoria son estacionales con un pico en invierno y primavera. Se producen epidemias de ambos al mismo tiempo con ciclos periódicos de 3-4 años.

La infección se transmite vía respiratoria, a través de sangre y sus derivados administrados de forma parenteral y, verticalmente, de la madre al feto. Puede detectarse ADN específico de B19V en secreciones respiratorias en el momento de la viremia. B19V puede transmitirse con escasa frecuencia a través de médula ósea y derivados sanguíneos como plaquetas, inmunoglobulina intravenosa y fibrina [103].

Como resultado del incremento en la búsqueda y estudio de este virus se han definido varios genotipos. Se ha sugerido que B19V debería clasificarse como eritrovirus de genotipo 1 (cepa prototipo Pvbaua), con las nuevas cepas A6 y K71 o LaLi como prototipos de genotipo 2 y el eritrovirus V9 como prototipo del genotipo 3 [98, 104]. Sin embargo y a pesar de la baja tasa de mutación de B19V, se están describiendo nuevas cepas que conllevan incluso la propuesta de nuevos subtipos del genotipo 3 (B19/3a y B19/3b) o del genotipo 1 (B19-1A y B19-1B) [105, 106].

3.2.3 Diagnóstico.

El diagnóstico de infección reciente o pasada por B19V recae en la detección de anticuerpos específicos contra proteínas de la cápsida. La detección de ADN del virus mediante técnicas de PCR, que pueden estandarizarse con un patrón internacional de ADN de parvovirus B19, resulta muy útil para el diagnóstico, ya que es la única técnica de detección directa disponible [98, 107]. Por el contrario, no existe un método adecuado para el aislamiento diagnóstico de rutina, aunque sí se pueden utilizar cultivos de médula ósea para investigación.

Diagnóstico serológico. Las infecciones agudas por B19V se confirman por reactividad de IgM específica, que es la prueba fundamental en el diagnóstico, mientras que la infección pasada se detecta por reactividad de IgG. En la mayoría de los casos, los anticuerpos IgM se dirigen a epítomos lineales y conformacionales de VP1 y VP2. Los anticuerpos IgM aumentan a partir de 3-7 días después de la infección.

La producción de IgG coincide con la disminución de la producción de IgM, aparece en torno a las dos semanas del inicio de la infección, y dura toda la vida. La reactividad de IgG frente a epítomos conformacionales de VP1 y VP2 persiste después de la infección, sin embargo la reactividad contra epítomos lineales, sobre todo frente a VP2, va disminuyendo y normalmente desaparece a lo largo de los 6 primeros meses de la infección [98].

Detección de genomas por PCR. La técnica de PCR incrementa la sensibilidad de detección de B19V, especialmente en casos de infección crónica en los que la demanda diagnóstica a menudo ocurre cuando ya se ha producido el aclaramiento de la IgM. Sin embargo, hay que tener en cuenta varios factores: es necesario evitar falsos positivos debidos a la carga de productos de amplificación

resultante de la alta viremia asociada a la infección, la detección de ADN de B19V en determinados tejidos no siempre indica infección aguda, la sensibilidad de los ensayos de PCR caseros debe contrastarse con el Estándar Internacional de la OMS para ADN de B19V (NIBSC 99/800), la variabilidad entre genotipos puede dar lugar a falsos negativos y, finalmente, los métodos de extracción deben ser adecuados para tejidos y no solo para suero o plasma. En pacientes inmunocompetentes, el ADN del virus puede detectarse en suero durante al menos un mes después de la infección. En infecciones crónicas el ADN viral puede persistir en el hospedador durante meses e incluso años en la médula ósea y en tejidos sinoviales cuando ya no se detectan anticuerpos. Además, se ha visto que puede persistir en individuos inmunocompetentes sanos a bajos niveles durante largos períodos de tiempo [95]. Con la introducción del Estándar Internacional de la OMS para ADN de B19V (NIBSC 99/800) es posible la normalización de los ensayos de PCR. La estandarización de estos métodos permitirá su uso para la selección rápida de productos de sangre y plasma. Además la PCR se puede convertir en una herramienta de detección de los nuevos genotipos de B19V [107].

3.3 Otros virus exantemáticos.

3.3.1 Adenovirus.

Los AdV se incluyen en el género *Mastadenovirus* (de 100 serotipos distintos, 51 afectan al hombre) de la familia *Adenoviridae*. Son virus icosaédricos, sin envoltura y con ADN bicatenario. La cápsida presenta proteínas en forma de hexones y pentones. Los AdV son causa frecuente de infección en edad pediátrica. El contagio se produce de persona a persona por inhalación, contacto de la mucosa conjuntival con manos sucias o secreciones suspendidas en el aire o por vía fecal-oral. También puede llegar al organismo por toallas, juguetes o agua contaminada, incluso de piscinas. En nuestro clima templado, se diagnostican infecciones por AdV durante todo el año.

La mitad de las infecciones son subclínicas y la mayoría autolimitadas, e inducen inmunidad específica que no evita la infección por serotipos diferentes. El período de incubación es de 2-14 días. Produce infecciones respiratorias, conjuntivitis,

infecciones gastrointestinales, cistitis hemorrágica e infecciones en inmunodeprimidos.

El diagnóstico microbiológico de AdV se realiza en muestras de lavados nasofaríngeos, exudados faríngeos y lavado broncoalveolar, raspados conjuntivales mediante detección de antígenos por inmunofluorescencia, aislamiento en células susceptibles y detección de genomas por PCR. La serología es de utilidad con fines epidemiológicos [108].

No existen demasiados antecedentes bibliográficos de exantemas producidos por AdV. En un estudio reciente se ha detectado AdV 4 y 5 mediante aislamiento en células A549 y PCR en cuatro niños con exantema morbiliforme y fiebre, vacunados con vacuna triple vírica [109].

El artículo de Ramsay et al de 2002 sobre las causas de exantema morbiliforme en niños con alta cobertura vacunal para sarampión y rubéola muestra 7 casos de infecciones por AdV de serotipos 1 (4 niños), 2 (2 niños) y 3 (un niño), una de ellas combinada con infección por estreptococo del grupo A, [110].

En otro estudio del año 2002 en el que se comparan los síntomas clínicos de niños con neumonía por AdV y niños con neumonía por causas diferentes se detecta una frecuencia significativamente mayor de exantema, entre otros síntomas extrapulmonares, en los pacientes con neumonía por AdV que en los pacientes con neumonía sin AdV [111].

3.3.2 Enterovirus.

El género *Enterovirus* pertenece a la familia *Picornaviridae*. Los EV no presentan envoltura, son icosaédricos con una cápsida compuesta por cuatro proteínas (VP1 a VP4) y su ARN es monocatenario de polaridad positiva. El género incluye 95 serotipos diferentes agrupados en tres especies: poliovirus, coxsackievirus A y B y echovirus, aunque algunos aún no se han podido asignar a ninguna especie. Recientemente, se ha propuesto otra clasificación en ocho especies en base a su homología genética.

La mayoría de las infecciones por enterovirus son asintomáticas. Suelen transmitirse por vía respiratoria y oral-fecal replicando en faringe e intestino y excretándose durante largos períodos de tiempo, especialmente por heces. Excepcionalmente pueden producir afectación sistémica infectando a diversos órganos como meninges,

SNC, miocardio, pericardio, músculo estriado y piel. Producen síndrome febril inespecífico sobre todo en lactantes menores de 3 meses; meningitis aséptica; encefalitis o meningoencefalitis; mielitis; polio y parálisis flácida aguda; exantema y enantema; herpangina; faringitis linfonodular aguda; síndrome boca-mano-pie; miopericarditis; pleurodinia o mialgia epidémica o enfermedad de Bornholm; miositis; conjuntivitis aguda hemorrágica; manifestaciones gastrointestinales como diarrea, vómitos y dolor abdominal o manifestaciones respiratorias con tos, bronquitis aguda, bronquiolitis y neumonía.

La infección durante el embarazo puede ser causa de aborto o prematuridad durante el primer trimestre de la gestación. Los recién nacidos infectados pueden ser asintomáticos o presentar diferentes enfermedades, como fiebre de origen desconocido que suele acompañarse de meningitis aséptica o exantema.

El diagnóstico de laboratorio se basa fundamentalmente en el aislamiento en líneas celulares y en las técnicas de PCR. La sensibilidad relativa del cultivo es de un 60-80%, y las principales muestras para el aislamiento son: heces, exudado rectal, exudado faríngeo o lavado nasofaríngeo y LCR. Es preciso utilizar varias líneas celulares para que puedan crecer todos los EV. La detección o confirmación del diagnóstico por cultivo se realiza por medio de inmunofluorescencia. Sin embargo, algunos virus coxsackie A son incapaces de crecer en cultivo. La PCR solventa esta deficiencia del cultivo además de poseer mayor sensibilidad, principalmente en LCR y sangre [112].

En un estudio de 1979 realizado en 1364 pacientes infectados por EV entre 1957 y 1976 se observó la presencia de exantema en individuos infectados con virus Coxsackie grupo A sobre todo, pero también con Echovirus o virus Coxsackie grupo B [113]. Asimismo, en otro estudio retrospectivo realizado sobre el diagnóstico clínico de 7075 pacientes con aislamiento de EV ocurrido en el período 1971-1975, se observó que la presencia de exantema era frecuente [114].

Además, se ha detectado infección por EV en niños vacunados frente a sarampión y rubéola que presentaban exantema morbiliforme [110, 115]. En el estudio de Ramsay et al se encontró EV en 9 (5%) de 195 niños ingleses con exantema morbiliforme ocurrido entre 1996 y 1998, mientras que en el estudio de Davidkin et al se detectó el virus en el 9% de 368 niños finlandeses con fiebre y exantema ocurrido entre 1983 y 1995.

Por otra parte, existen diversos estudios que afirman que la presencia de exantema es uno de los síntomas clínicos de la enfermedad por EV en neonatos y en brotes en neonatos ocurridos intrahospitalariamente [116-120]. Y finalmente también se ha detectado la presencia de EV en pacientes con meningitis o enfermedad severa del sistema nervioso central concomitantemente con exantema [121, 122].

3.3.3 Herpesvirus.

Los virus de la familia *Herpesviridae* poseen un ADN lineal de doble cadena incluido en una cápsida icosaédrica de 162 capsómeros, rodeada de una envuelta lipoproteica de 110 a 220 nm de diámetro. Entre la envuelta y la cápsida se encuentra el tegumento constituido por proteínas e hidratos de carbono. Todos ellos se caracterizan por producir latencia en células nerviosas (herpesvirus neurotropos) o linfoides (herpesvirus linfotropos) con reactivaciones más o menos frecuentes durante la vida.

Herpesvirus humano 6 (HHV-6): Pertenece al género *Roseolovirus* de la subfamilia *Betaherpesvirinae* y es un herpesvirus linfotropo. La infección primaria, en niños menores de dos años, produce síndrome febril inespecífico y exantema súbito (roseola infantum o sexta enfermedad). Complicaciones como meningoencefalitis y hepatitis fulminante son infrecuentes en la infancia. En adultos, la primoinfección por HHV-6 puede producir un síndrome similar a la mononucleosis. En pacientes inmunodeprimidos, se produce la reactivación del virus más frecuentemente que en individuos sanos, sin síntomas o con un síndrome febril inespecífico.

El diagnóstico se realiza por detección de IgM específica utilizando técnicas de inmunofluorescencia y ELISA, aunque se pueden producir reacciones cruzadas con HHV-7, HHV-4 y HHV-5; o por detección del ADN mediante PCR [123].

Citomegalovirus humano (HHV-5): Pertenece al género *Cytomegalovirus* de la subfamilia *Betaherpesvirinae* y es un herpesvirus linfotropo. La primoinfección suele producirse en la infancia siendo generalmente asintomática. Sin embargo, en pacientes adultos puede producir un síndrome mononucleósico. Estas infecciones primarias pueden, en ocasiones, cursar con exantema. La infección en la embarazada, puede transmitirse al feto provocando infección congénita, siendo el 25% sintomáticas, o perinatal que generalmente son asintomáticas. En pacientes

inmunodeprimidos se produce un síndrome febril con malestar general, artromialgia, leucopenia, linfocitosis atípica, trombopenia y elevación de transaminasas. En este tipo de pacientes se puede producir enfermedad invasora: hepatitis, esofagitis, gastroenteritis, colitis o neumonía. En los pacientes receptores de trasplante de órgano sólido la acción directa del virus puede producir manifestaciones indistinguibles del rechazo al injerto como hepatitis, glomerulonefritis necrosante, miocarditis, neumonía o pancreatitis. En pacientes con SIDA, en raras ocasiones, se puede producir retinitis o polirradiculopatía.

En cuanto al diagnóstico de laboratorio, el cultivo celular en fibroblastos humanos por el sistema de "shell-vial" presenta la mejor predictividad en sangre. Por otra parte, también se puede detectar el antígeno de la fosfoproteína de matriz pp65 en leucocitos de sangre periférica por medio de la técnica denominada antigenemia que es más sensible que el cultivo y muy específica. Los métodos cuantitativos de detección de ADN vírico (PCR a tiempo real) son una alternativa a la antigenemia. Por último, la serología es útil en la determinación del estado inmunitario, por ejemplo para el cribado de donantes o receptores de órgano, pero tiene muy poco valor para el diagnóstico de la infección sintomática, en particular si se trata de reactivaciones de una infección latente [124], aunque es la técnica de más utilidad para el diagnóstico de la primoinfección, como es el caso de los exantemas.

Virus Epstein-Barr (HHV-4): Pertenece al género *Lymphocryptovirus* de la subfamilia *Gammaherpesvirinae*, familia *Herpesviridae* y es un herpesvirus linfotropo. Presenta un genoma lineal durante la fase lítica y circular durante la fase latente.

La manifestación clínica más característica en individuos sanos es la mononucleosis infecciosa, que puede cursar con exantema, especialmente en pacientes tratados con ampicilina, lo cual es algo relativamente frecuente, ya que un síntoma temprano de la mononucleosis es una faringitis exudativa que puede confundirse con la faringitis estreptocócica. Asimismo, puede producir infección crónica activa similar a la mononucleosis pero con una duración mayor de 6 meses. El síndrome de Duncan y distintos tumores (carcinoma nasofaríngeo, linfoma de Burkitt o enfermedad de Hodgkin) se asocian a este virus. En pacientes trasplantados, especialmente de médula ósea, produce enfermedad linfoproliferativa. En pacientes seropositivos a VIH

provoca leucoplaquia vellosa de la cavidad oral, neumonía intersticial linfoide o linfomas no hodgkinianos.

La detección cualitativa del genoma no es diagnóstica, por sí misma, de mononucleosis infecciosa, ya que el virus está presente con mucha frecuencia en personas sanas. Por ello, el diagnóstico de la primoinfección y de la mononucleosis infecciosa se realiza por técnicas serológicas que demuestren infección reciente. La prueba que detecta anticuerpos heterófilos de clase IgM es sencilla y rápida, suele ser positiva en el 60% de casos en la segunda semana de la enfermedad, aunque la reactividad puede aparecer más tarde y persistir meses o hasta un año. Sin embargo, en niños pequeños la enfermedad cursa con frecuencia sin estos anticuerpos heterófilos. Por lo tanto, si el resultado de la prueba es negativo debe recurrirse a la detección de anticuerpos específicos. En la primoinfección se generan rápidamente anticuerpos frente a antígenos de fase lítica, como VCA (antígenos de la cápsida vírica). La presencia de IgM anti-VCA, detectada por inmunofluorescencia indirecta (IFI), asegura el diagnóstico de infección reciente o activa, mientras que la inmunoglobulina G anti-VCA puede persistir toda la vida. Sin embargo, hay que tener en cuenta que existen reacciones cruzadas entre HHV-4 y HHV-5 y que la IFI es una técnica que siempre adolece de una cierta carga de subjetividad, por lo que es importante disponer de un criterio adicional, como es el que combina la presencia de IgG anti-VCA con ausencia de IgG anti-EBNA (antígeno nuclear). Durante la fase aguda también se pueden detectar anticuerpos contra antígenos tempranos EA/D (difusos) que no persisten más de 6 meses, momento en que empiezan a detectarse los antígenos tempranos EA/R (restringidos) que pueden o no persistir toda la vida. Los anticuerpos anti-EBNA aparecen después de los IgG anti-VCA a partir del segundo o tercer mes de la primoinfección al ser aquellos antígenos de latencia. Por tanto, la primoinfección reciente también puede diagnosticarse por una seroconversión o una elevación en el título de anti-EBNA [125, 126].

3.3.4 Virus del dengue.

El grupo dengue que incluye los serotipos 1 al 4 del virus del dengue pertenece al género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*. Los viriones tienen una estructura compleja. Son esféricos, con un diámetro de 40-60 nm y están constituidos por una envuelta lipídica derivada de la membrana de la célula huésped y una nucleocápsida de

simetría poliédrica; con espículas en la superficie. El genoma está formado por una única molécula de ARN lineal monocatenario de sentido positivo, con 11.000 nucleótidos de longitud [127].

Desde el punto de vista clínico esta enfermedad se presenta como fiebre de dengue clásica, que puede darse en forma de fiebre bifásica y acompañada en algunos casos de exantema (a menudo confluyente en tronco y extremidades) y petequias o gingivorragia. Más raramente tiene un curso severo como shock por dengue y como dengue hemorrágico asociados a reinfecciones o infecciones secundarias, por cualquiera de los cuatro serotipos conocidos [92]. Entre otras enfermedades el dengue se puede confundir con sarampión por lo cual es necesario establecer un diagnóstico diferencial en países endémicos.

La IgM específica de dengue es detectable por técnica de ELISA en infecciones agudas o secundarias sobre el sexto día del comienzo de la enfermedad, y disminuye en 60 a 90 días. Es importante distinguir entre infección primaria o secundaria en caso de dengue agudo para identificar aquellos pacientes que presentan mayor riesgo de desarrollar las formas graves de la enfermedad. Para llevar a cabo esta clasificación se puede recurrir a la técnica de ELISA para determinar tanto la relación IgM/IgG como el índice de avidéz de la IgG, ambos mayores en infecciones secundarias que en primarias. El diagnóstico serológico presenta el problema de la reacción cruzada existente con otros flavivirus. También se puede realizar el aislamiento del virus, o la detección de su genoma mediante PCR en un suero de fase aguda y en diversos tejidos *post mortem* [128, 129].

OBJETIVOS

1. **Desarrollo y evaluación de una técnica de PCR múltiple para la detección simultánea del virus del sarampión, virus de la rubéola y parvovirus B19**, que permita el diagnóstico de infecciones por virus del sarampión al mismo tiempo que se inicia el diagnóstico diferencial con los dos virus que “a priori” son los más importantes en la producción de cuadros exantemáticos clínicamente similares. Evaluación comparativa de su eficacia para el diagnóstico de sarampión frente al cultivo y la detección de IgM específica como técnicas de referencia.
2. **Evaluación de muestras alternativas al suero, como la sangre seca en papel de filtro y el exudado faríngeo en tampón de lisis de ARN, para el diagnóstico de la infección por virus del sarampión** en lugares donde las condiciones para la obtención, conservación y envío de muestras clínicas clásicas (suero, orina y/o exudado faríngeo) no sean adecuadas por diferentes motivos.
3. **Estudio de la etiología de los exantemas víricos infantiles en el contexto de una alta cobertura de vacunación frente a sarampión y rubéola**, mediante la realización de un estudio prospectivo en niños con exantema que no cumplan la definición de caso de sarampión atendidos en consultas pediátricas de atención primaria.
4. **Desarrollo de tecnología molecular para genotipificado del virus del sarampión** basada en las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud para la armonización del genotipificado de dicho virus.
5. **Estudio de los patrones generales de circulación de genotipos de virus del sarampión en España entre los años 2001 y 2008** y de su significado como indicadores del estadio de eliminación de la enfermedad.
6. **Determinación del origen geográfico de las cepas de virus del sarampión detectadas en España entre los años 2001 y 2008 y establecimiento de las fuentes principales de importación.**

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MUESTRAS Y CEPAS.

1.1 Cepas de virus.

Para la realización de este trabajo se utilizaron las cepas vacunales Schwarz de MeV y Wistar RA27/3 de RUBV (GlaxoSmithKline S.A., Madrid) y una muestra que contiene partículas de B19V observables por microscopía electrónica. Asimismo, se dispuso de un panel de B19V procedente de un ensayo multicéntrico de control de calidad para PCR de B19V del "National Institute for Biological Standards and Control" (Hertfordshire, Reino Unido) [130] y de otro panel de distintos genotipos de MeV [21, 131] preparado por el Laboratorio de Referencia de Sarampión de los Centros para el Control y Prevención de la Enfermedad (Atlanta, USA). Este panel de MeV incluía las cepas Edmonston-wt.USA/54 (genotipo A, nº de acceso en GenBank: U03669, U01987), Illinois.USA/89/1 "Chicago 1" (D3; M81895, U01977), Palau.BLA/93 (D5; L46757, L46758), Bangkok.THA/93/1 (D5; AF009575, AF079555), Maryland.USA/77 "JM" (C2; M81898, M89921), New Jersey.USA/94/1 (D6; L46749, L46750), Hunan.CHN/93/7 (H1; AF045201, AF045212), Montreal.CAN/89 (D4; AF079554, U01976) y Yaounde.CAE/12.83 "Y-14" (B1; AF079552, U01998).

Las cepas del panel de MeV se subcultivaron en la línea celular B95a para su posterior mantenimiento a -80°C .

Para evaluar la especificidad del ensayo se usaron cepas de virus parainfluenza 1, 2, 3, 4A y 4B, AdV 5, virus de la parotiditis, virus respiratorio sincitial A y B y virus de la encefalitis equina del este, procedentes de la colección del Instituto de Salud Carlos III.

1.2 Muestras post-vacunación y del biobanco del ISCIII.

Se utilizaron las muestras procedentes de la colección del ISCIII que se detallan en la Tabla 8 de la sección 2.2 de Resultados. Estas muestras se dividieron en cinco grupos para una mejor valoración de los resultados. El grupo 1, constituido por cinco exudados faríngeos y cuatro sueros, procedían de cinco niños implicados en un brote de MeV en Soria en 1992. El grupo 2 incluye 22 LCR y 11 sueros de pacientes con encefalitis asociada a MeV. El grupo 3 está compuesto por 3 muestras de orina, 3

sueros IgM positivos para RUBV y 2 exudados faríngeos procedentes de un recién nacido con síndrome de rubéola congénita; además de un suero positivo a IgM de RUBV, de la madre. En este grupo, una orina, un exudado faríngeo y un suero se recogieron 15 días después del nacimiento; la segunda orina, exudado faríngeo y suero 37 días después del nacimiento, y las últimas muestras de orina y suero se recogieron 38 días después del nacimiento. El grupo 4, procedente del Centro de Salud Condes de Barcelona (Galapagar, Madrid), estaba constituido por muestras postvacunales: 27 exudados faríngeos y 4 muestras de orina de 26 niños vacunados recogidos entre los días 10 y 14 después de la vacunación con vacuna triple vírica en el año 1998. Finalmente, el grupo 5 estaba formado por 19 muestras de suero (14 positivas y 5 negativas a IgM frente a B19V) de 19 pacientes afectados por un brote de eritema infeccioso ocurrido en Soria en 1998.

Las condiciones de almacenamiento fueron diferentes para cada grupo de muestras: las de los grupos 2 y 5 se mantuvieron congeladas a -20°C ; las del grupo 2, al igual que los sueros de los grupos 1 y 3, fueron congeladas y descongeladas un número de veces desconocido con el fin de realizar diferentes pruebas serológicas a lo largo del tiempo. Las distintas muestras de sueros, de los grupos 1 y 3, se mantuvieron varios días a 4°C antes de congelarlas a -70°C . Las muestras del grupo 4 se dividieron en dos alícuotas y se congelaron a -80°C inmediatamente después de su llegada al laboratorio (Tabla 8).

1.3 Muestras clínicas del Plan Nacional de Eliminación del Sarampión.

La definición de caso de sarampión dada por la OMS e incluida en el Plan Nacional de Eliminación del Sarampión, incluye:

1. Exantema maculopapular de más de tres días de duración.
2. Fiebre mayor de 38°C .
3. Al menos uno de los siguientes síntomas: tos, coriza o conjuntivitis.

En todos los casos compatibles con esta definición se recomienda que se recojan muestras de suero, exudado faríngeo y orina en la primera visita médica de los pacientes.

De cada paciente sospechoso de presentar la enfermedad se solicita una ficha epidemiológica (Figura 4) y se le asigna un número constituido por las iniciales SAR,

año de declaración, número de la provincia que lo declara y número de caso en dicha provincia. Por ejemplo: SAR0105555 sería el caso 555 ocurrido en la provincia de código 05 en el año 2001 (Figura 4).

Las muestras son enviadas a los laboratorios de cada Comunidad Autónoma, que constituyen la Red de Laboratorios del Plan de Eliminación del Sarampión. Para aquellas determinaciones de técnicas no disponibles en los laboratorios primarios, las muestras se envían al Laboratorio Nacional de Referencia del CNM (Instituto de Salud Carlos III). Los sueros se ensayan para IgM de MeV, RUBV y B19V y, tanto la orina como el exudado faríngeo se inoculan en la línea celular B95a. Además, se realiza determinación de RT-PCR múltiple para MeV, RubV y B19 en todas las muestras. Entre los años 2001 y 2008 se estudiaron en el CNM 3551 muestras procedentes de 2132 casos, sobre los que se realizaron 8776 determinaciones (Tabla 5), con una distribución por comunidades autónomas que se muestra en la Tabla 6. Se utilizaron para el estudio muestras procedentes de un brote de sarampión ocurrido en la provincia de Almería entre enero y junio del año 2003 con un total de 317 casos. De estos casos, se incluyeron en el estudio los 246 pacientes de los que se disponía de grupos completos de muestras (suero, orina y exudado faríngeo). Ciento veintiocho eran hombres (52.1%) y 118 (47.9%) mujeres, con una media de edad de $15,5 \pm 12,5$ años y un rango de 0 a 60 años. Ciento dieciséis (47,15%) tenían entre 20 y 35 años mientras que 44 (17,9%) eran menores de 15 meses. Las muestras fueron recogidas y procesadas siguiendo las recomendaciones de la OMS [132]. La mayoría de las muestras se enviaron a 4°C tan pronto como fueron recogidas, mientras que una minoría se recibió congelada en nieve carbónica. Después de procesadas, dichas muestras se almacenaron a -80°C.

	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	Total
<i>Nº Casos Estudiados</i>	65	133	497	84	85	459	498	313	2132
<i>Nº Muestras</i>	102	165	1124	118	147	736	586	573	3551
<i>Nº Determinaciones</i>	332	500	4114	382	326	1081	1096	945	8776

Tabla 5. Casos del Plan Nacional de Eliminación del Sarampión estudiados en el CNM desde el año 2001.

CCAA	2001		2002		2003		2004		2005		2006		2007		2008		Total
	C*	I*	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	
<i>Andalucía</i>	2	10	3	3	246	86	9	6	1	8	0	6	0	7	21	176	584
<i>Aragón</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Asturias</i>	0	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
<i>I. Baleares</i>	0	7	0	0	0	2	1	6	0	2	1	0	0	0	1	0	20
<i>I. Canarias</i>	1	0	0	2	0	0	2	1	2	0	5	49	0	1	0	0	63
<i>Cantabria</i>	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	3
<i>Castilla-La Mancha</i>	0	3	0	2	3	21	0	1	1	2	0	2	2	7	0	3	47
<i>Castilla y León</i>	0	5	1	1	0	0	0	0	0	2	1	1	10	16	2	1	40
<i>Cataluña</i>	0	1	0	0	0	0	0	12	1	7	0	24	0	375	0	0	420
<i>Ceuta</i>	0	3	0	2	0	2	0	4	0	2	0	1	0	0	3	3	20
<i>Extremadura</i>	1	9	1	8	0	5	0	1	0	2	0	2	0	2	0	1	32
<i>Galicia</i>	0	2	0	3	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	7
<i>La Rioja</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	13	2	0	0	2	34
<i>Madrid</i>	2	2	0	35	4	63	1	18	5	30	6	294	2	57	3	77	599
<i>Melilla</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Murcia</i>	0	1	0	0	1	5	0	1	0	1	1	9	0	3	1	2	25
<i>Navarra</i>	0	1	0	0	0	4	0	0	0	0	0	4	0	1	1	1	12
<i>País Vasco</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	1	1	0	0	6
<i>C. Valenciana</i>	0	14	0	71	0	52	0	19	0	19	0	17	0	11	1	14	218
Total	65		133		497		84		85		459		498		313		

*C: casos sospechosos con grupo de muestras completo: suero, exudado faríngeo y orina. I: casos sospechosos sin grupo de muestras completo.

Tabla 6. Casos del Plan Nacional de Eliminación del Sarampión recibidos en el CNM por CCAA y año, indicando cuantos tienen un grupo completo de muestras.

1.4 Muestras de sangre seca en papel de filtro y exudado faríngeo en tampón de lisis de extracción de ácidos nucleicos.

Se obtuvieron 43 muestras de sangre completa secada en papel de filtro procedentes de dos brotes de sarampión ocurridos en Guinea Ecuatorial en los años 2001 (20 muestras) y 2008 (23 muestras). De los pacientes del segundo brote se recogieron además 23 exudados faríngeos incluyéndolos, para su transporte, en el tampón de

lisis del extractor automático de ácidos nucleicos totales MagNA Pure LC v3.01 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).

Sobre estas muestras se determinó IgM específica de MeV mediante dos equipos comerciales, uno basado en una técnica de ELISA indirecto (Enzygnost, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., EEUU) y el otro en la captura de cadenas pesadas (μ) por ELISA (Chemicon, USA). Asimismo se determinó la presencia de genomas de MeV, RUBV y B19V mediante PCR. Posteriormente, los casos positivos fueron genotipificados.

Durante el primer brote se consiguieron 20 muestras de 19 pacientes con edades comprendidas entre 3 meses y 7,5 años desde febrero a mayo de 2001 en Bata (Guinea Ecuatorial). Las muestras fueron recogidas durante los tres primeros días de aparición del exantema. Se tomaron en el Hospital Regional de Bata y se mantuvieron a temperatura ambiente (22-30°C) con una humedad relativa del 90% hasta su envío a nuestro laboratorio. Fueron almacenadas a 4°C hasta que fueron ensayadas no más de dos meses después. Teniendo en cuenta que una pieza circular de papel de 3 mm de diámetro correspondía aproximadamente a 4,8 μ l de sangre completa [133], en cada ensayo serológico se usó el volumen adecuado de tampón de dilución de muestra para alcanzar la dilución correspondiente (1:40 para ELISA indirecto y 1:200 para el de captura). Las pruebas serológicas se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. La PCR de exantemáticos se llevó a cabo con una gota completa de sangre seca, dejando que el papel de filtro se embebiera en 500 μ l de agua libre de ARNasas durante 15 min del que luego se extrajeron 100 μ l de sobrenadante como se describe más adelante en la sección 4.1. En las muestras positivas se estudió el genotipo del virus mediante PCR de genotipificado y secuenciación genómica.

En el brote del año 2008 se obtuvieron 23 muestras de exudados faríngeos en tampón de lisis y 23 de sangre seca en papel Whatman de 23 niños con síntomas de sarampión agudo procedentes de nueve barrios diferentes de Malabo y cuatro de Bata (Guinea Ecuatorial). Las muestras se recogieron entre 2 y 15 días desde el comienzo de los síntomas y se mantuvieron a 4°C hasta su envío a nuestro laboratorio en España, donde fueron almacenadas a 4°C hasta que fueron ensayadas no más de dos meses después. La edad de los pacientes estaba comprendida entre 4 meses y 7 años. Todas las muestras de exudado faríngeo y de sangre seca en papel

Whatman fueron analizadas para ARN de MeV en la PCR de exantemáticos y además, se probaron todas las muestras de sangre seca en papel Whatman para IgM específica de MeV por ELISA indirecto. En ELISA indirecto se usaron 4 piezas circulares de papel de 3 mm de diámetro y el volumen adecuado de tampón de dilución de muestra para alcanzar la dilución 1:40. Las pruebas serológicas se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. La PCR de exantemáticos se llevó a cabo con 2 piezas circulares de papel de 3 mm de diámetro, primero se permitió que el papel de filtro se embebiera en 150 µl de agua libre de ARNasas durante 15 min, luego se extrajeron 100 µl de sobrenadante en el robot de extracción de ácidos nucleicos MagNA Pure LC, versión 3.01 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). En las muestras positivas se estudió el genotipo del virus mediante PCR de genotificado y secuenciación genómica.

1.5 Muestras clínicas de exantema vírico infantil en el contexto de una alta cobertura de vacunación con triple vírica.

La etiología de los exantemas que afectan a niños en la actual situación de alta cobertura vacunal se evaluó gracias a un estudio realizado entre el 5 de junio de 2001 y el 6 de junio del 2003 en la Comunidad de Madrid en el cual se extrajo suero y exudado faríngeo a ochenta y ocho pacientes. Los criterios de inclusión de los pacientes en el estudio fueron:

1. Edad menor de 15 años.
2. Presencia de exantema.
3. Fiebre, febrícula y/o afectación general.

Ante la presencia de un caso que cumplía los criterios de inclusión, los médicos pediatras de atención primaria participantes, tras informar a los padres y obtener el consentimiento para participar en el estudio, les realizaron un cuestionario. Se recogió información sobre el estado de vacunación con vacuna triple vírica de los niños a través de las cartillas de vacunación y de los registros de las historias clínicas.

Se recogieron muestras de exudado faríngeo y suero de 51 niños y 37 niñas con exantema, cuya media de edad era de 30 meses con un rango entre 3 meses y 12

años. La cobertura vacunal incluía 37 pacientes vacunados con una dosis de vacuna triple vírica, 8 con dos y 43 sin precedentes confirmados de vacunación.

En los exudados faríngeos recolectados se realizó una PCR múltiple de enterovirus-herpesvirus (EV, HHV1, HHV2, HHV3, HHV-4, HHV-5 y HHV-6) [134], PCR múltiple para virus exantemáticos (MeV, RUBV, B19V) [135] y PCR frente a AdV [136]. Los resultados positivos se confirmaron en una segunda alícuota.

En los sueros se realizaron las pruebas de detección de IgM, IgG e índice de avidéz para cada uno de los virus mencionados (Tabla 7).

	<i>IgG</i>	<i>IgM</i>	<i>IA</i>
<i>Sarampión</i>	Si	Si	No
<i>Rubéola</i>	Si	Si	Si
<i>Parvovirus B19</i>	Si	Si	No
<i>Virus herpes humano 6</i>	No	Si	No
<i>HHV-5 (Citomegalovirus)</i>	Si	Si	No
<i>HHV-4 (Virus Epstein-Barr)</i>	Si	Si	No

Tabla 7. Pruebas serológicas realizadas en un panel de muestras de niños con exantema de la Comunidad Autónoma de Madrid.

Se establecieron los siguientes criterios para la interpretación de los resultados obtenidos:

- Infección aguda por MeV: IgM positiva y/o PCR positiva.
- Infección aguda por RUBV: IgM positiva e índice de avidéz de IgG menor de 40 y/o PCR positiva.
- Infección aguda por HHV-6, HHV-5 o HHV-4: IgM positiva o IgM indeterminada.
- Reactivación de infección por HHV-6, HHV-5 o HHV-4: IgM negativa, IgG positiva y PCR positiva.
- Infección aguda por B19V: IgM positiva y/o PCR positiva.
- Infección por EV: PCR positiva y tipificación Poliovirus/No Poliovirus.
- Infección por AdV: PCR positiva.

2. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO.

El diagnóstico serológico se realizó en el Laboratorio de Serología del Servicio de Microbiología Diagnóstica del Centro Nacional de Microbiología, ISCIII. Excepto en el

caso de las muestras de exantema vírico infantil en que el diagnóstico serológico se llevó a cabo en el Laboratorio de Salud Pública de la Comunidad de Madrid.

2.1 Sarampión.

El diagnóstico serológico de MeV se basó en la detección de IgM específica por ELISA indirecto (Enzygnost, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Antes de utilizar este método indirecto las muestras fueron tratadas con una IgG antihumana (RF Absorbens, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., EEUU) para eliminar la IgG y evitar así falsos positivos debidos al factor reumatoide. Los resultados equívocos para IgM obtenidos en dos alícuotas distintas del mismo suero fueron considerados como positivos en el caso de que no existiera un segundo suero de convalecencia. En determinados casos, como en las muestras recibidas durante el brote ocurrido en Almería en 2003, también se realizó la detección de IgG específica (Enzygnost, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., EEUU) y ensayos de avidéz. La avidéz de IgG se estableció realizando dos determinaciones simultáneas, la primera en la forma convencional y la segunda añadiendo un lavado con urea 8M después de la incubación antígeno-anticuerpo. El cálculo del índice de avidéz resulta del cociente de la absorbancia obtenida en el ensayo en condiciones desnaturalizantes respecto a la absorbancia convencional, cociente que se multiplica por 100 [137].

2.2 Rubéola.

El diagnóstico serológico de RUBV se llevó a cabo mediante detección de IgM específica por ELISA indirecto (Enzygnost, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., EEUU) y/o de captura de cadenas pesadas (Platelia Rubella IgM, BIO-RAD, Francia). Antes de utilizar métodos indirectos las muestras fueron tratadas con una IgG antihumana (RF Absorbens, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., EEUU) para eliminar la IgG y evitar así falsos positivos debidos al factor reumatoide. El ensayo de avidéz usado en muestras clínicas de exantema vírico infantil (sección 1.5) fue Euroimmun (Lübeck, Alemania). Todos los métodos se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

2.3 Parvovirus B19.

Se utilizó la detección de IgM específica por medio de ELISA de captura (Parvovirus B19 IgM EIA, Biotrin, Irlanda) para el diagnóstico de infección por B19V en suero. El método se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.4 Otros virus.

Asimismo, se realizó el diagnóstico serológico de los virus HHV-6, HHV-5 y HHV-4 en los sueros procedentes de casos con exantema vírico infantil, estudiados en el contexto de una alta cobertura de vacunación con triple vírica (sección 1.5). Para ello se detectó IgM e IgG específicas de: HHV-6 (IFI BIOTRIN IgM Herpes 6 y EIA IgG HERPES 6 Biotrin, Irlanda), HHV-5 (Enzygnost Anti-CMV/IgM y Enzygnost Anti-CMV/IgG, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., EEUU) y antígeno de la cápsida viral (VCA) de HHV-4 (VCA IgG ELISA Wampole, Inverness Medical Professional Diagnostics, Princeton, NJ, EEUU). Por otro lado, también se efectuó ensayo de IgG contra el complejo antígeno nuclear (EBNA) (EBNA IgG ELISA Wampole, Inverness Medical Professional Diagnostics, Princeton, NJ, EEUU) y el antígeno temprano (EA) de HHV-4 (EA-D IgG ELISA Wampole, Inverness Medical Professional Diagnostics, Princeton, NJ, EEUU).

3. AISLAMIENTO EN CULTIVO CELULAR

3.1 Pretratamiento de las muestras.

Todas las muestras fueron tratadas, en una cabina de bioseguridad de clase II, con una solución decontaminante (penicilina 8000 UI/ml, estreptomina 8000 µg/ml, gentamicina 1600 µg/ml, anfotericina B 25.6 µg/ml y suero bovino fetal al 50%) antes de la inoculación en cultivos celulares. Las muestras de orina además se neutralizaron con hidróxido sódico. Se inocularon 200 µl de muestra tratada en cada tubo. El medio de cultivo utilizado fue Minimal Essential Medium (Gibco BRL, Life Technologies Inc., Scotland) o RPMI 1640 (Cambrex Bio Science Verviers, Bélgica)

con suero bovino fetal (10% para crecimiento y 2% para mantenimiento celular) más solución decontaminante y bicarbonato sódico (0.028% para medio de crecimiento y 0.044% para medio de mantenimiento).

3.2 Muestras post-vacunación y del biobanco del ISCIII.

En el caso de las muestras post-vacunación (sección 1.2), se inocularon 200 µl de espécimen en un tubo de cultivo celular de 12 ml (CELLSTAR de Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania) con un 75-85% de confluencia de células de cada una de las líneas celulares RK13 y Vero. Cada tubo de cultivo se monitorizó para detectar efecto citopático (ECP) dos veces por semana. Después de 10 días sin ECP se realizó un pase de ambas líneas celulares a tubos de RK13 recientes.

Las células que presentaban efecto citopático y todos los subcultivos fueron dispuestos y fijados en un portaobjetos para analizar la presencia de MeV o RUBV usando inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales específicos para cada virus: anti-sarampión de Biosoft (Paris, Francia) y anti-rubéola de Chemicon International Inc. (Temecula, CA, USA), seguido de conjugado antiratón marcado con fluoresceína (Sigma, St. Louis, MO, USA). Los sobrenadantes de las células RK13 fueron analizados por PCR múltiple de MeV, RUBV y B19V.

Las muestras de exudado faríngeo del grupo 1 de la colección del ISCIII (sección 1.2) se inocularon en la línea B95a.

Todas las cepas aisladas se almacenaron a -80°C .

3.3 Muestras clínicas del Plan Nacional de Eliminación del Sarampión.

Las muestras de orina se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 min a 4°C y el sedimento se resuspendió en 2 ml de medio RPMI, siguiendo las instrucciones de la OMS [132]. Después de tratar los sedimentos de orina y los exudados faríngeos con la mezcla mencionada en la sección 3.1 de antibióticos y antifúngicos, se inocularon en la línea celular B95a. Para ello, se añadieron 200 µl de muestra a cada tubo, preparado a un nivel de confluencia del 75 al 85% y con medio RPMI fresco más antibióticos, antifúngico y bicarbonato sódico. Los tubos de cultivo celular fueron monitorizados para presencia de MeV diariamente, si no se observaba ECP se hacía

un subcultivo 1:3 con tripsina a los 7-10 días y se observaba el pase diariamente durante otros 7-10 días. Posteriormente, la presencia o ausencia de MeV se confirmaba usando inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales específicos según protocolo descrito anteriormente (sección 3.2).

3.4 Muestras clínicas de exantema vírico infantil en el contexto de una alta cobertura de vacunación con triple vírica.

Se inocularon 200 µl de cada uno de los exudados faríngeos positivos a AdV por PCR en un tubo de cultivo a un nivel de confluencia del 75 al 85% de la línea celular A549 (células epiteliales de carcinoma de pulmón humano) y 200 µl de cada uno de los exudados faríngeos positivos a EV en un tubo de cultivo a un nivel de confluencia del 75 al 85% de las líneas MRC-5 (fibroblastos de pulmón humano) y RD (células de rhabdomiosarcoma humano), siendo monitorizada la aparición de ECP dos veces en semana. Tras dos semanas sin observar efecto citopático los tubos fueron desechados después de comprobar la ausencia de virus con los anticuerpos monoclonales específicos para AdV (Biosoft, París, Francia) y EV (Dako, Dinamarca) siguiendo un protocolo similar al mencionado en la sección 3.2.

4. MÉTODOS DE AMPLIFICACIÓN GENÓMICA

En el momento del uso de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos se tomaron precauciones para evitar contaminaciones por arrastre, como utilizar puntas de pipeta con barrera contra aerosoles en cuatro áreas diferentes para preparación de mezclas de reacción, manejo de muestras y extractos, manejo de tubos amplificados de primera reacción y detección de los productos finales de amplificación. En cada área se utilizó bata de laboratorio, material de plástico y vidrio y micropipetas diferentes. En las tres primeras se trabajó en cabina de bioseguridad clase II. Todos los resultados positivos por PCR se confirmaron en una segunda alícuota de la misma muestra preparada en el Laboratorio de Admisión de Muestras del Centro Nacional de Microbiología, para evitar falsos positivos debidos a contaminación con productos amplificados procedentes de pruebas previas.

4.1 Extracción de ácidos nucleicos.

Manual: El material genético fue extraído de las muestras clínicas siguiendo un protocolo descrito previamente basado en extracción con tiocianato de guanidinio y posterior precipitación con alcohol [138]. Este protocolo se aplicó hasta el año 2003. Como sistema de control interno, se introdujeron en el tampón de lisis 500 moléculas/ml de un plásmido utilizado previamente en nuestro laboratorio [134] obteniéndose 200 copias del plásmido por tubo de reacción. Se partió de 100 µl de muestra para resuspender el sedimento final en 20 µl de agua libre de nucleasas, apta para biología molecular.

Automática: Desde enero del año 2003 se usó el robot de extracción de ácidos nucleicos MagNA Pure LC en su versión 3.01 de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania) siguiendo el protocolo para ácidos nucleicos totales con lisis externa y partiendo de 100 µl de muestra para acabar eluyendo en 50 µl de tampón de elución. En el tampón de lisis se introdujeron 8600 moléculas/ml del mismo plásmido que se utilizó en la extracción manual como control interno.

4.2 PCR de enterovirus-herpesvirus.

Se utilizó un ensayo previamente descrito que amplifica ARN de EV y ADN de los siguientes herpesvirus: HHV-1 y 2, HHV-3, HHV-4, HHV-5 y HHV-6 [134].

4.3 PCR de adenovirus.

Esta técnica previamente descrita amplifica un fragmento del gen de la proteína del hexón y es capaz de detectar ADN de 47 tipos de AdV humanos en distintas clases de muestras [136].

4.4 Purificación de los productos de la PCR de genotipificado de MeV.

Se mezclaron 40 µl de los productos de amplificación obtenidos con la PCR de genotipificado de MeV con 40 µl de acetato amónico 5 M, se añadieron 80 µl de isopropanol, se volvieron a mezclar en un "Vortex" y se centrifugó la mezcla 10 min a

4°C y 13.000 rpm. El sobrenadante se desechó y después se añadieron 200 µl de etanol al 70%, se mezcló y centrifugó otros 10 min a 4°C, 13.000 rpm. El sobrenadante se volvió a desechar y los tubos con el sedimento se dejaron secar totalmente. Posteriormente, se suspendió el sedimento en 10 µl de agua libre de ARNasas [36].

Desde marzo del año 2008 se utiliza para la purificación de los productos de la PCR el equipo comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega (Madison, WI, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.5 Secuenciación de ácidos nucleicos.

La reacción de secuenciación se llevó a cabo en ambas cadenas de ADNc mezclando 4 µl de BigDye terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), 2 µl de uno de los iniciadores GSAR2F o GSAR2R diseñados para la PCR de genotipificado (ver sección 6.1 de Resultados) con concentración 5 µM, 2 µl de agua libre de ARNasas y 2 µl de producto de amplificación en un tubo de PCR de 200 µl. Dicha reacción de secuenciación se realizó en un termociclador PTC-200 Peltier (MJ Research, Watertown, MA) en las siguientes condiciones: 94°C durante 3 min para desnaturalizar el ADN y 25 ciclos de 93°C 10 seg., 60°C 5 seg. y 60°C 4 min. Los productos de amplificación se enviaron al Laboratorio de Biopolímeros del ISCIII, donde se determinó la secuencia mediante un secuenciador automático ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando el método enzimático de terminación de cadena con didesoxinucleótidos o método de Sanger.

4.6 Análisis de secuencias de ácidos nucleicos.

A partir de las secuencias complementarias de ambas cadenas de ADNc se obtuvo una secuencia consenso mediante el programa SeqMan del paquete informático DNASTAR (Lasergene, DNASTAR, Inc., Madison, WI, EEUU). El alineamiento frente a secuencias de referencia se ejecutó con los programas Clustal X (EMBL, Heidelberg, Alemania, May 1994) [139] y/o BioEdit versión 7.0.9.0 [140]. Los árboles filogenéticos fueron construidos con el programa MEGA 3.1 y 4.1 [141, 142]

siguiendo el método Neighbor-Joining (Kimura 2 parámetros, 1000 replicaciones de "bootstrap") [143].

Como criterio de asignación de genotipo se estableció que la secuencia detectada estuviera asociada a una secuencia de referencia de la OMS con un "bootstrap" mínimo de 90.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

En el estudio de marcadores diagnósticos del brote de Almería 2003, se utilizó el test t de Student para comparar las medias de los días transcurridos desde la aparición del exantema hasta el diagnóstico por detección de IgM específica o por PCR de virus exantemáticos. Asimismo, se utilizó el método estadístico Chi cuadrado corregido con el test exacto de Fisher de dos colas para comparar la efectividad diagnóstica de las dos técnicas de detección de MeV, IgM y PCR.

RESULTADOS

1. DESARROLLO DE UNA PCR MÚLTIPLE PARA VIRUS DEL SARAMPIÓN, DE LA RUBÉOLA Y PARVOVIRUS B19.

1.1 Diseño de los iniciadores o “primers”.

Para el diseño de los iniciadores de la PCR, denominada en este trabajo PCR múltiple de virus exantemáticos, se obtuvieron secuencias desde la base de datos GenBank, de los genes de la nucleoproteína N del MeV, la glicoproteína E1 del RUBV y las proteínas de la cápsida VP1 y VP2 de B19V. Los genes para el diseño se eligieron teniendo en cuenta el número de secuencias encontradas en GenBank, los trabajos publicados en cada virus, y en el caso de MeV el hecho de que el gen de la nucleoproteína es el primero en replicarse incluso en casos de PEES. Las secuencias de cada virus fueron alineadas usando la aplicación MEGALIGN del paquete informático DNASTAR (DNASTAR INC., Madison, WI, EEUU), alineamiento que se usó para el diseño de los iniciadores (Figura 5) [135]. Estos iniciadores fueron sintetizados por la empresa Pharmacia (Biotech Freiburg, Alemania). Los criterios para el diseño de los iniciadores fueron los siguientes:

1. El tamaño debía estar entre 18 y 22 nucleótidos.
2. El tamaño del fragmento amplificado de los tres virus debía de ser lo suficientemente diferente como para ser fácilmente discriminable por electroforesis en gel de agarosa.
3. La base del extremo 3´ no debía situarse en la tercera posición del codón.
4. La temperatura de hibridación de cada par de iniciadores debía ser similar.

A. INICIADORES DE SARAMPIÓN

Sar1F 5' C G G A G C T A A G A A G G T G G A T A A 3'
 SecA×62
 SecB×2 T
 SecC×1 T

Sar1R 5' C T C C C A T G G C A T A G C T C C A 3'
 Alineam 5' T G G A G C T A T G C C A T G G G A G 3'
 SecA×64
 SecB×1 T

Primera reacción. Tamaño de la banda: 443 pb. Iniciador Sar1F, situado entre las posiciones 680 y 700. Iniciador Sar1R, entre las posiciones 1105 y 1123. Posiciones referidas a la secuencia K01711(cepa Edmonston), Billeter 1984.

Sar2F 5' C C A G G A T T G C T G A A A T G A T A T G 3'
 SecA×52
 SecB×13 . . . T

Sar2R 5' A A C T T G T T C T G A A T T G A G T T C T C 3'
 Alineam 5' G A G A A C T C A A T T C A G A A C A A G T T 3'
 SecA×49
 SecB×16 A

Segunda reacción. Tamaño de la banda: 229 pb. Iniciador Sar2F, entre las posiciones 851 y 872. Iniciador Sar2R, entre las posiciones 1057 y 1079. Posiciones extraídas de la secuencia K01711 (cepa Edmonston), Billeter 1984. Números de acceso de las secuencias incluidas en el alineamiento: AF045205, AF045206, AF045207, AF045208, AF045209, AF045210, AF045211, AF045212, AF045213, AF045214, AF045215, AF045216, AF045217, AF045218, D63925, D63927, E04903, K01711, L46728, L46730, L46740, L46744, L46733, L46746, L46748, L46750, L46753, L46756, L46760, L46764, L46758, M89921, M89922, S58435, U01974, U01976, U01977, U01978, U01987, U01988, U01989, U01990, U01991, U01992, U01993, U01994, U01995, U01996, U01998, U01999, U03650, U03653, U03656, U03658, U03661, U03664, U03668, U29317, X01999, X13480, X16566, X16567, X16568, X16569, Z66517.

B. INICIADORES DE RUBÉOLA

Rube1F 5' C G T C T G G C A A C T C T C C G T 3'
 SecA×36
 SecB×2 . . . T
 SecC×1 G

Ru1TR 5' C G T A T G T G G A G T C C G C A C T T 3'
 Alineam 5' A A G T G T G G A C T C C A C A T A C G 3'
 SecA×35 C
 SecB×3 T
 SecC×1 C G

Primera reacción. Tamaño de la banda: 380 pb. Iniciador Rube1F, entre las posiciones 8745 y 8762. Iniciador Ru1TR, entre las posiciones 9106 y 9125. Posiciones obtenidas de la secuencia M15240, cepa Therien. Frey 1986.

Rube2F 5' C A C G C C G C A C G G A C A A C T 3'
 SecA×38
 SecB×1 G

Rube2R 5' G A G A G C C T A T G A C A G G C G T G A 3'
 Alineam 5' T C A C G C C C G T C A T A G G C T C T C 3'
 SecB×26 T
 SecA×11 C
 SecC×2 C T

Segunda reacción. Tamaño de la banda: 289 pb. Iniciador Rube2F entre las posiciones 8808 y 8825. Iniciador Rube2R entre las posiciones 9077 y 9097. Posiciones extraídas de la secuencia M15240, cepa Therien. Frey 1986. Números de acceso: AB003337, AB003338, AB003339, AB003340, AB003341, AB003342, AB003343, AB003344, AB003345, AB003346, AB003347, AB003348, AB003349, AB003350, AB003351, AB003352, AB003355, D00156, D50673, D50674, D50675, D50676, D50677, L16228, L16229, L16230, L16231, L16232, L16233, L16234, L16235, L16236, L78917, L19420, L19421, M15240, M30776, X05259, X14871.

C. INICIADORES DE PARVOVIRUS B19

EPV1+ 5' C A G A A G C C A G C A C T G G T G C A 3'
 SecA×47
 SecB×2 T

EPV1- 5' A T G G T G C A A A C C T T T G C C T C 3'
 Alineam 5' G A G G C A A A G G T T T G C A C C A T 3'
 SecA×43
 SecB×5 A
 SecC×1 A T

Primera reacción. Tamaño de la banda: 211 pb. Iniciador EPV1+, entre las posiciones 3323 y 3342. Iniciador EPV1- entre las posiciones 3514 y 3533. Posiciones extraídas de la secuencia completa de la cepa HV: AF162273, Gallinella (no publicada).

EPV2+ 5' C A A A A G C A T G T G G A G T G A G G 3'
 SecA×40
 SecB×6 . . . T
 SecC×1 . . . A
 SecD×1 . . . G
 SecE×1 . . . M

EPV2- 5' G T G C T C T G G G T C A T A T G G A A 3'
 Alineam 5' T T C C A T A T G A C C C A G A G C A C 3'
 SecA×39
 SecB×5 T
 SecC×2 T
 SecD×1 . . . C
 SecE×1 G
 SecF×1 . . . C G

Segunda reacción. Tamaño de la banda: 94 pb. Iniciador EPV2+ entre las posiciones 3366 y 3385. Iniciador EPV2- entre las posiciones 3440 y 3459. Posiciones extraídas de la secuencia completa de la cepa HV: AF162273, Gallinella (no publicada). M: A ó C. Números de acceso: AB015949, AB015950, AB015951, AB015952, AB015953, AB015959, AB030673, AB030693, AB030694, AF113323, AF161223, AF161224, AF161225, AF161226, AF161228, AF162273, AF221904, AF221905, AF264149, N000883, M13178, U31358, U38506, U38507, U38508, U38509, U38510, U38511, U38512, U38513, U38514, U38515, U38516, U38517, U38518, U38546, U53593, U53594, U53595, U53596, U53597, U53598, U53599, U53600, U53601, Z68146, Z70528, Z70560, Z70599.

Figura 5. Iniciadores de cada virus. En la primera columna se indica, después del signo "x", el número de secuencias de cada tipo encontradas.

1.2 Ajuste de parámetros de primera reacción de PCR.

Se usó el equipo comercial Access RT-PCR de Promega (Madison, WI, EEUU) para realizar una reacción de transcripción inversa y amplificación en un sólo paso. Inicialmente se titularon en unas condiciones tentativas las cepas vacunales Schwarz de MeV, Wistar RA27/3 de RUBV (GlaxoSmithKline S.A., Madrid) y una muestra que contiene partículas de B19V observables por microscopía electrónica, para establecer una dilución de trabajo A (alta concentración vírica) con la que observar posibles efectos de aparición de bandas inespecíficas múltiples y otra B (baja concentración vírica) con la que evaluar el efecto sobre la sensibilidad. Seguidamente, se llevaron a cabo una serie de experimentos utilizando ambas diluciones de cada uno de los tres virus, para establecer las concentraciones óptimas de SO_4Mg (Figura 6), desoxinucleótidos trifosfato e iniciadores (Figura 7), así como las temperaturas óptimas de hibridación (Figura 8) y de desnaturalización (Figura 9).

Figura 6. Estandarización de la concentración de SO_4Mg para B19V. P: Tubo de PCR sólo con iniciadores de B19V. M: Tubo de PCR con iniciadores de los tres virus. 1 a 6 mM: concentraciones de SO_4Mg probadas.

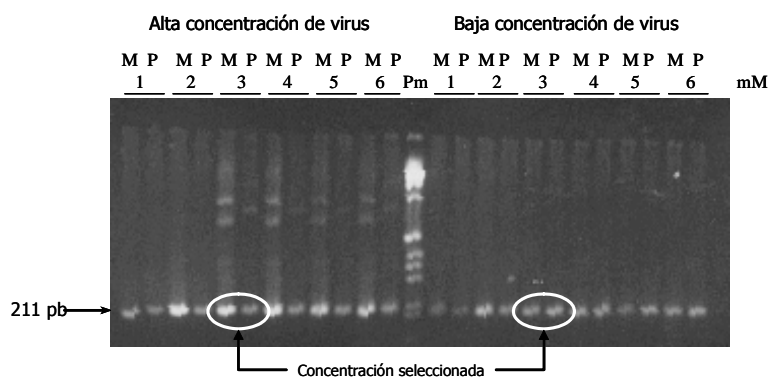


Figura 7. Estandarización combinada de la concentración de iniciadores y dNTPs en el caso de MeV. 22: dilución de 200 μM dNTPs y 0,2 μM de iniciadores; 25: dilución de 200 μM dNTPs y 0,5 μM de iniciadores; 210: dilución de 200 μM dNTPs y 1 μM de iniciadores; 52: dilución de 500 μM dNTPs y 0,2 μM de iniciadores; 55: dilución de 500 μM dNTPs y 0,5 μM de iniciadores y 510: dilución de 500 μM dNTPs y 1 μM de iniciadores. S: Tubo de PCR sólo con iniciadores de sarampión. M: Tubo de PCR con iniciadores de los tres virus.

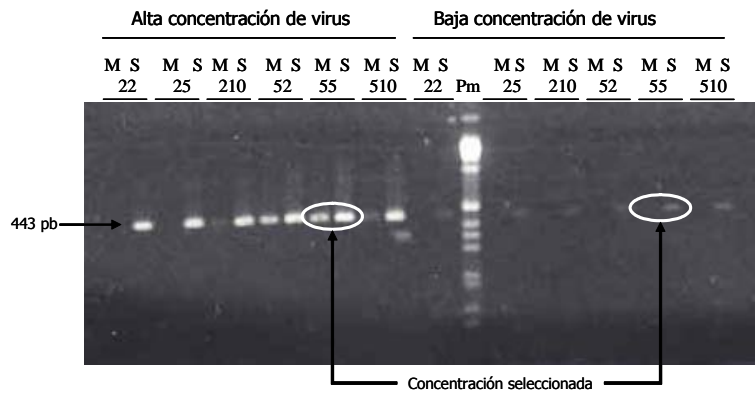


Figura 8. Estandarización de la temperatura de hibridación de MeV. M: tubo con iniciadores de los tres virus. S: tubo con iniciadores de MeV. 0 a -3: diluciones 10^{-1} a 10^{-3} de MeV.

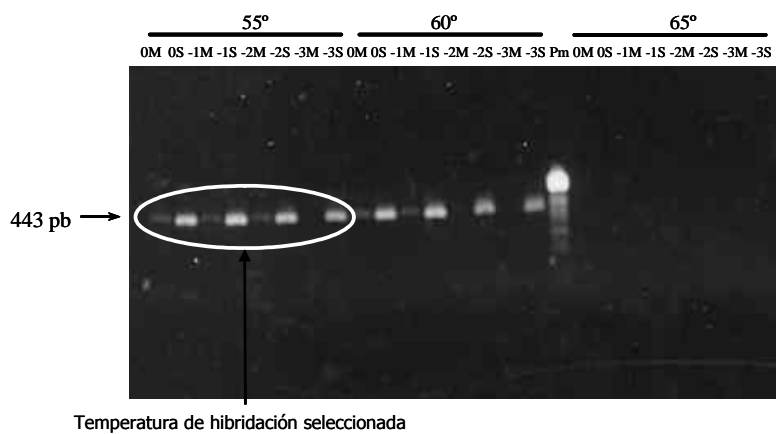
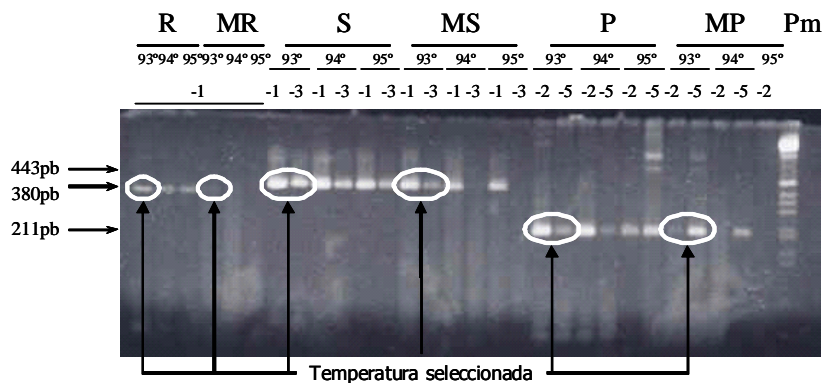


Figura 9. Estandarización de la temperatura de desnaturalización para los tres virus, RUBV, MeV y B19V. R: tubos con iniciadores de RUBV. S: tubos con iniciadores de MeV. P: tubos con iniciadores de B19V. MR, MS, MP: tubos con iniciadores de los tres virus probados para RUBV, MeV y B19V respectivamente. -1, -3, -2, -5: diluciones 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-2} y 10^{-5} utilizadas con los distintos virus.



En base a estos experimentos se seleccionaron las condiciones óptimas de la primera reacción de PCR: 5 μ l del extracto obtenido de la muestra a estudiar se mezclaron con 3 mM de SO_4Mg ; 500 μ M de cada uno de los dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP); 0,5 μ M de cada uno de los iniciadores de MeV, RUBV y B19V específicos para la primera reacción (Figura 5); 10 μ l de AMV/Tfl 5x (tampón de la reacción); 5 U de transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar y 5 U de ADN polimerasa de *Thermus flavus* en un tubo de PCR hasta conseguir un volumen final de 50 μ l.

En la mezcla final se incluyeron un par de iniciadores específicos del plásmido de control interno a una concentración final de 0,2 μ M cada uno (sección 1.4). Se utilizó un termociclador PTC-200 Peltier (MJ Research, Watertown, MA, EEUU) para estandarizar las temperaturas de la primera reacción de PCR. Se obtuvo así el siguiente programa: 45 min a 48°C para la transcripción inversa y 2 min a 94°C para inactivar la transcriptasa inversa y desnaturalizar el ADNc, seguido de 30 ciclos de: 1 min de desnaturalización a 93°C, 1 min de hibridación a 55°C y 1 min de elongación a 72°C. La elongación se extendió a 5 min en el último ciclo [135].

1.3 Ajuste de parámetros de segunda reacción de PCR o anidada.

Las condiciones de segunda reacción se obtuvieron realizando experimentos de estandarización similares a los de la primera reacción (Figura 10, Figura 11, Figura 12 y Figura 13).

Figura 10. Estandarización de la concentración de Cl_2Mg para los tres virus. MA: tubos con iniciadores para los tres tipos de virus y probados con una concentración alta de cada uno. MB: tubos con iniciadores para los tres tipos de virus y probados con una concentración baja de cada uno.

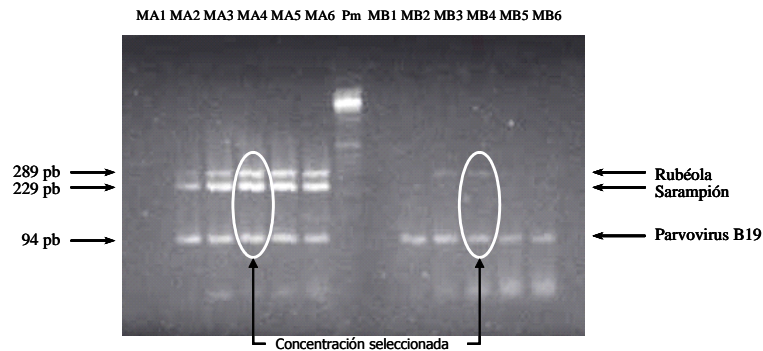


Figura 11. Estandarización de la concentración de desoxinucleótidos trifosfato e iniciadores para MeV, RUBV y B19V. 22: dilución de 200 μM dNTPs y 0,2 μM de iniciadores; 25: dilución de 200 μM dNTPs y 0,5 μM de iniciadores; 210: dilución de 200 μM dNTPs y 1 μM de iniciadores, 52: dilución de 500 μM dNTPs y 0,2 μM de iniciadores; 55: dilución de 500 μM dNTPs y 0,5 μM de iniciadores, 510: dilución de 500 μM dNTPs y 1 μM de iniciadores; 102: dilución de 1000 μM dNTPs y 0,2 μM de iniciadores; 105: dilución de 1000 μM dNTPs y 0,5 μM de iniciadores y 1010: dilución de 1000 μM dNTPs y 1 μM de iniciadores.

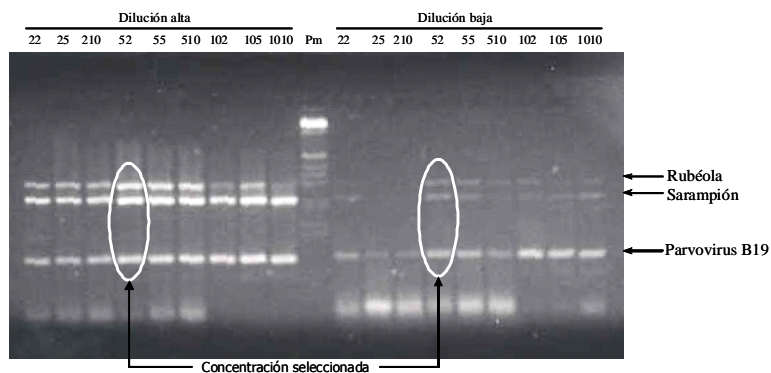


Figura 12. Estandarización de la temperatura de hibridación a 50, 55, 60 y 65°C. B: tubo con concentración baja de cada virus. A: tubo con concentración alta de cada virus.

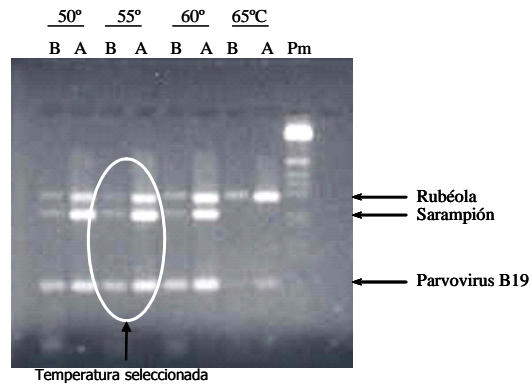
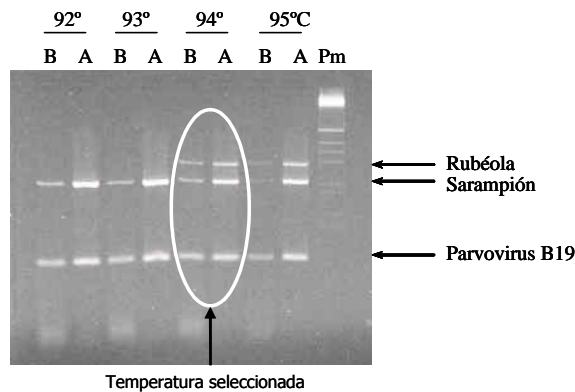


Figura 13. Estandarización de la temperatura de desnaturalización de MeV, RUBV y B19V a 92, 93, 94 y 95°C. B: tubo con concentración baja de cada virus. A: tubo con concentración alta de cada virus.



En la segunda reacción de la PCR de exantemáticos se añadió 1 µl del producto de la primera amplificación a 49 µl de una nueva mezcla en la que se incluyeron los distintos componentes a las concentraciones óptimas obtenidas durante la estandarización: 4 mM de Cl₂Mg, 500 µM de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 0,2 µM de iniciadores de segunda reacción (Figura 5), 0,2 µM de los iniciadores del control interno específicos para la reacción anidada (sección 1.4), 5 µl del tampón 10x PCR II (Roche Molecular Systems Inc., NJ, USA) y 0,25 U de Taq DNA Polymerase (Amplitaq DNA polymerase, Roche Molecular Systems Inc., NJ, USA). En

el termociclador PTC-200 Peltier (MJ Research, Watertown, MA, EEUU) se utilizaron las temperaturas óptimas de hibridación y desnaturalización según el siguiente programa: 2 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de: 1 min de desnaturalización a 94°C, 1 min de hibridación a 55°C y 1 min de elongación a 72°C. La elongación también se prolongó 5 min en el último ciclo.

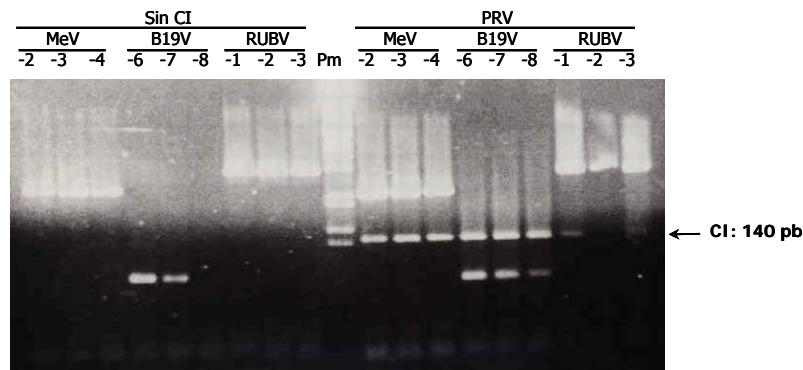
Se visualizaron los productos de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con 0,5 µg de bromuro de etidio por ml en tampón Tris-borato-EDTA bajo luz ultravioleta. El tamaño esperado de las bandas era de 289 pb en el caso de RUBV, 229 pb en el de MeV y 94 pb en el de B19V. Las muestras positivas presentaban la banda específica para uno de los tres virus y la banda de 140 pb del control interno (sección 1.4). Cuando aparecía solamente la banda de control interno, las muestras se consideraban negativas. Las muestras que no mostraban banda alguna se repitieron desde la fase de extracción, y las que continuaban careciendo de bandas después de la repetición se asumió que contenían inhibidores de enzimas [135].

1.4 Inclusión de un control interno.

Como control interno de cada tubo de PCR se utilizó un sistema puesto a punto previamente en el laboratorio para la técnica de PCR múltiple de enterovirus y herpesvirus humanos, que detectaba un fragmento de 194 pb del gen de la polimerasa del virus de la pseudorrabia porcina (PRV) [134].

Se comprobó que no se producía ninguna pérdida en el rendimiento de la PCR diseñada enfrentando la mezcla que incluía el plásmido y sus iniciadores correspondientes a otra mezcla sin plásmido ni sus iniciadores en tres diluciones distintas de cada uno de los tres virus (Figura 14).

Figura 14. Inclusión de un control interno. Diluciones 10^{-2} a 10^{-4} de MeV, 10^{-6} a 10^{-8} de B19V y 10^{-1} a 10^{-3} de RUBV detectadas en tubos sin control interno (Sin CI) y tubos con control interno e iniciadores específicos (PRV) en la mezcla.



1.5 Obtención de un control positivo de ADN cuantificable de cada virus.

Se purificaron productos de la primera reacción de las cepas vacunales de MeV y RUBV, y de la cepa de laboratorio de B19V usando el equipo comercial GeneClean II y se ligaron al plásmido pGEM-T utilizando pGEM-T Vector System II (Promega, Madison, WI, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. La transformación de los plásmidos se realizó en células competentes de alta eficiencia (Epicurian coli SL1-Blue; Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, EEUU). Posteriormente, se seleccionaron transformantes en placas de medio Luria-Bertoni con ampicilina, IPTG y X-Gal, y la presencia de la inserción esperada se confirmó por PCR. Se purificaron los plásmidos con el equipo Wizard Plus SV Minipreps (Promega, Madison, WI, EEUU) y el número de copias de plásmido en la suspensión final fue estimado por espectroscopía a una densidad óptica de 260 nm [135].

2. EVALUACIÓN DE LA PCR MÚLTIPLE

2.1 Sensibilidad y especificidad de la PCR múltiple de exantemáticos.

A partir de las cepas vacunales Schwarz de MeV y Wistar RA27/3 de RUBV (GlaxoSmithKline de España, Madrid), y de la muestra que contenía partículas de B19V visibles por microscopía electrónica se obtuvieron bandas de amplificación de la

longitud esperada para cada uno de los virus (Figura 15), y no se observó amplificación cruzada con los demás virus utilizados (parainfluenza 1, 2, 3, 4A y 4B; AdV 5; virus de la parotiditis; virus respiratorio sincitial A y B y virus de la encefalitis equina del este). Para comprobar la sensibilidad de la técnica se hicieron experimentos de diluciones seriadas 1/10 con las cepas vacunales comparando la PCR con el aislamiento de RUBV en la línea celular RK13, y con el aislamiento de MeV en células B95a. Dichos experimentos mostraron sensibilidades de la PCR de 0,04 dosis infectiva en cultivo tisular 50% (TCID₅₀) para RUBV y 0,004 TCID₅₀ para MeV (Figura 16 y Figura 17) calculadas por el Método de Reed-Muench [144].

Figura 15. Bandas de RUBV (289 pb), MeV (229pb), B19V (94 pb) y control interno (140 pb) obtenidas con la PCR múltiple de exantemáticos.

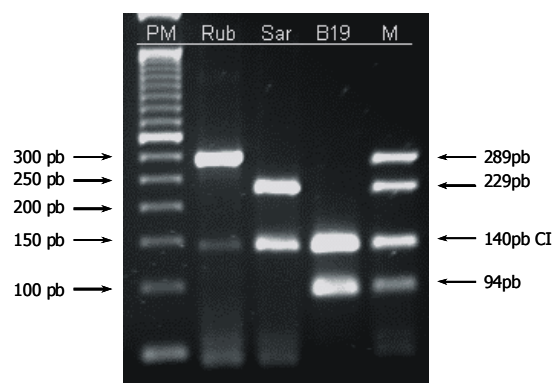


Figura 16. ID₅₀ de cultivo de MeV vacunal en B95a detectada por PCR. Pm: peso molecular de producción propia.

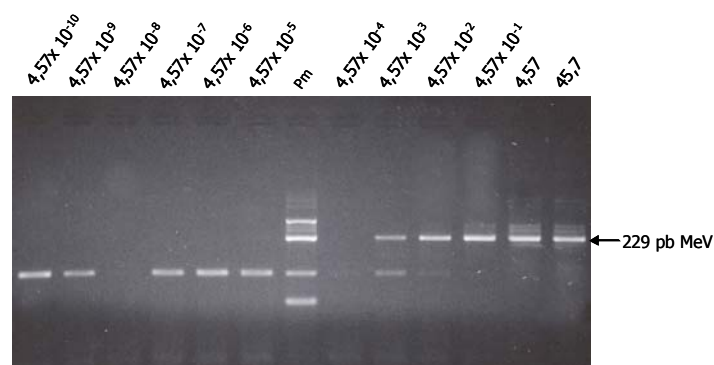
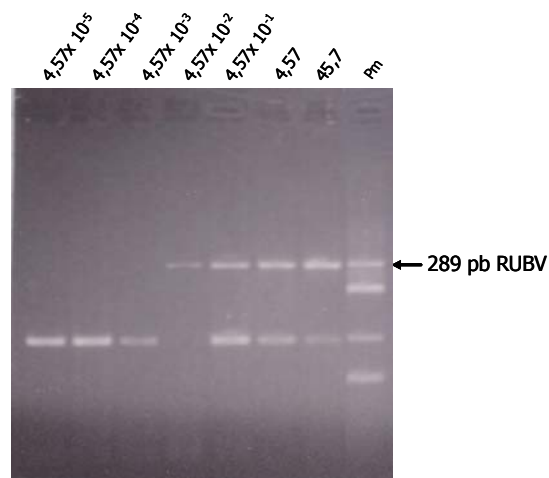


Figura 17. ID₅₀ de cultivo de RUBV vacunal en RK13 detectada por PCR. -8 a -1: diluciones 10⁻⁸ a 10⁻¹. Pm: peso molecular de producción propia.



En experimentos de diluciones del plásmido que contenía inserciones de los productos de la primera reacción de amplificación de cada uno de los tres virus, la técnica fue capaz de detectar 10 moléculas en el caso de MeV y RUBV y 1 molécula en el de B19V [135]. Teniendo en cuenta la carga de muestra y el factor de dilución introducido a lo largo de todo el ensayo, estas cantidades equivaldrían a una sensibilidad máxima teórica de 40 y 100 moléculas por ml de muestra utilizando extracción manual o automática, respectivamente, para parvovirus B19 y 400 y 1000 para sarampión y rubéola.

2.2 Valoración de la PCR múltiple de exantemáticos en muestras clínicas del biobanco del ISCIII y en muestras clínicas post-vacunación.

Los cinco exudados faríngeos procedentes de pacientes con sarampión agudo que forman el grupo 1 fueron positivos, mientras los cuatro sueros fueron negativos (Tabla 8).

Entre los 22 LCR del grupo 2 se detectó ARN de MeV en 2 muestras, pero no se obtuvo amplificación en ninguno de los 11 sueros.

Dos exudados faríngeos tomados a los 15 y 37 días después del nacimiento y una orina a los 37 días procedentes del caso de síndrome de rubéola congénita (grupo 3)

resultaron positivos a RUBV. Tampoco se obtuvo amplificación con ningún suero en este caso.

Se detectó RUBV en tres exudados faríngeos procedentes de los 27 niños vacunados del grupo 4. En uno de ellos se aisló el virus, el segundo fue negativo y el último no pudo cultivarse debido a alta contaminación fúngica en la muestra. Ningún niño mostró excreción de MeV.

Finalmente, se detectó ADN de B19V en 16 de 19 sueros de pacientes con eritema infeccioso (grupo 5), 14 de los 19 sueros eran positivos también por detección de IgM específica, uno presentaba un resultado indeterminado y 4 eran IgM negativa [135].

En lo que se refiere a la inoculación en líneas celulares, ni los cinco exudados faríngeos del grupo 1 ni las muestras del grupo 4 rindieron ningún aislamiento.

Sarampión					
<i>Tipo de muestra</i>	Total	Positivo ^a	Negativo	IgM ^b	Conservación (°C)
Grupo 1: Brote sarampión:					
<i>Exudado faríngeo</i>	5	5	0		-70 (después de varios días a -4)
<i>Suero</i>	4	0	4	4 Pos	
Grupo 2: Casos neurológicos:					
<i>LCR</i>	22	2	20		-20 (congelado y descongelado varias veces)
<i>Suero</i>	11	0	11	3 Pos, 5 Neg	
Grupo 4: M. prospectivas:					
Niños vacunados:					-70
<i>Exudado faríngeo</i>	27	0	27 ^d		
<i>Orina</i>	4	0	4		
Rubéola					
Grupo 3: Síndrome rubéola congénita:					
<i>Exudado faríngeo RN^d</i>	2	2	0		-70 (después de varios días a -4)
<i>Suero RN</i>	3	0	3	3 Pos	
<i>Orina RN</i>	3	1	2		
<i>Suero de la madre</i>	1	0	1	1 Pos	
Grupo 4: M. prospectivas:					
Niños vacunados:					-70
<i>Exudado faríngeo</i>	27	3	24 ^c		
<i>Orina</i>	4	0	4		
Parvovirus B19					
Grupo 5: Eritema infeccioso:					
<i>Suero</i>	19	16	3	14 Pos, 1 Eq, 4 Neg	-20

^aPositivo solo al virus especificado y negativo a los dos restantes. ^bPos: positivo, Neg: negativo, Eq: equívoco.

^c Se detectó un paciente con virus herpes simple y otro con EV. ^d RN: recién nacido.

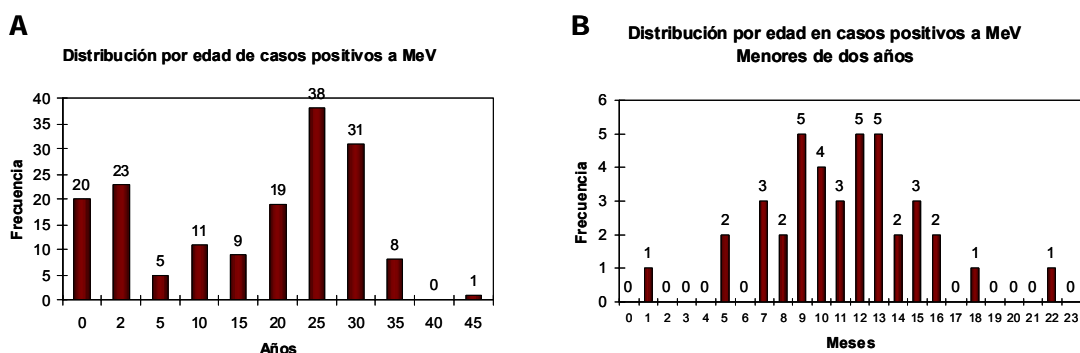
Tabla 8. Resultados de muestras clínicas con la RT-PCR múltiple de exantemáticos (MeV, RUBV, B19V).

3. VALORACIÓN DE LA PCR MÚLTIPLE EN EL CONTEXTO DE UN BROTE DE MeV OCURRIDO EN LA PROVINCIA DE ALMERÍA.

3.1 Marcadores de infección.

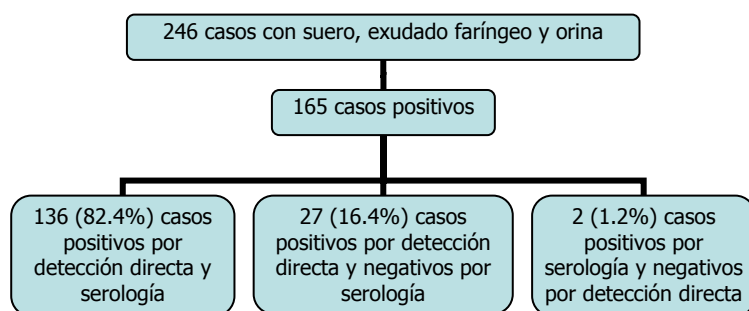
Ciento sesenta y cinco casos de 246 con grupos completos de muestras (suero, orina y exudado faríngeo), fueron positivos al menos por un marcador de infección por MeV, 84 eran hombres (50.9%) y 81 mujeres (49.1%). La media de edad en años de los pacientes positivos fue $16 \pm 11,32$, con un rango de menos de un año a 44 años, aunque el 58,2% (96) tenían entre 20 y 35 años y un 19,4 % (32) tenían 15 meses o menos (Figura 18).

Figura 18. Distribución por edad de los casos positivos a MeV. A. Casos de 0 a 45 años. B. Casos menores de 2 años.



Un total de 136 de los 165 casos positivos a MeV lo fueron por ambos métodos, directo e indirecto, mientras que 27 fueron positivos sólo por métodos directos de detección (PCR y/o cultivo) y 2 casos lo fueron solamente por detección de IgM (Figura 19). En el caso de los 27 pacientes que fueron positivos solo por técnicas directas el tiempo transcurrido entre la aparición del exantema y la recogida de muestras fue significativamente más bajo (media: 0,9 días, intervalo de confianza del 95%: 0,4 a 1,4) en comparación con el transcurrido en los 138 casos que tenían diagnóstico positivo por detección de IgM específica (media de 1,8 días con intervalo de confianza del 95% de 1,5 a 2,1) según el test t de Student ($P < 0,05$).

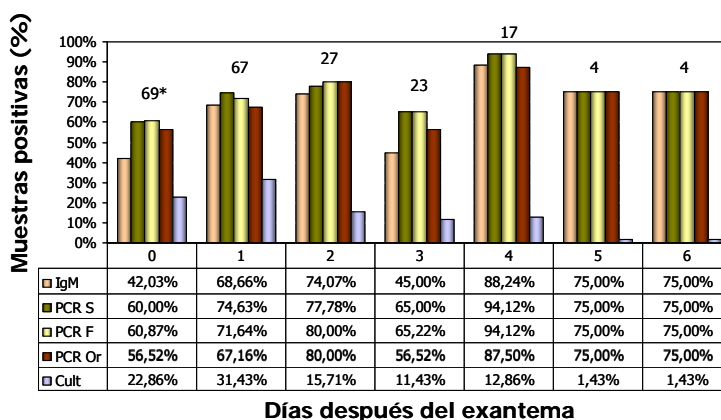
Figura 19. Esquema de resultados obtenidos en el brote de Almería.



Se obtuvieron resultados de IgM de MeV positivos o equívocos en 138 casos. Ciento cinco muestras de sueros, 161 exudados faríngeos y 152 orinas dieron resultado positivo a MeV por PCR de exantemáticos. Se obtuvo aislamiento del virus en células B95a en 73 muestras de orina (Figura 20). La PCR resultó ser un marcador diagnóstico significativamente más efectivo que el aislamiento, como demuestra el método de Chi cuadrado corregido por el test exacto de Fisher de dos colas, cuyo valor P fue $<0,05$. La PCR en exudado faríngeo resultó ser también significativamente más efectiva que en orina ($P<0,005$). Además, la detección por PCR teniendo en cuenta ambas muestras, exudado faríngeo y orina, también fue significativamente más efectiva que la detección de IgM ($P<0,01$).

El genotipo (B3) del caso índice se pudo determinar retrospectivamente en un suero almacenado en el hospital donde ingresó [36].

Figura 20. Distribución de los resultados de la detección de IgM en suero (IgM), resultados de PCR en suero (PCR S), resultados de PCR en exudado faríngeo (PCR F), resultados de PCR en orina (PCR Or) y aislamiento de SAR en orina (Cult Or) en porcentaje, por día después de la aparición del exantema.



* Número de muestras recibidas por día

3.2 Caracterización de casos PCR positiva e IgM negativa.

Con el fin de caracterizar mejor la respuesta inmune en los casos PCR positiva con ausencia de IgM se utilizó el ensayo de avidéz de la IgG específica de MeV, cuando ésta era detectable. Para minimizar la variación interensayo, los valores de avidéz de IgG fueron corregidos en cada ensayo, asignando un valor de 100% al porcentaje de reducción medio de dos determinaciones del control positivo del ensayo y refiriendo a este valor el porcentaje de reducción de cada muestra, para obtener así un índice de avidéz corregido (IAC). Para ello se estudiaron los siguientes grupos de pacientes:

- i. Treinta y nueve pacientes con resultado de detección directa (PCR de exantemáticos y/o cultivo de MeV) e IgM positivos,
- ii. Sesenta y nueve pacientes con detección directa e IgM negativos,
- iii. Dos pacientes con detección directa negativa e IgM positiva,
- iv. Nueve pacientes con detección directa positiva e IgM negativa, de los 27 que mostrando este perfil eran IgG positivos;
- v. Un grupo control constituido por 23 mujeres sanas seropositivas para IgG de MeV, que sirvió para valorar la avidéz de IgG en ausencia de infección.

Se compararon los resultados de los pacientes de cada uno de los grupos con los resultados del grupo control. El valor medio de IAC obtenido en el grupo control fue de 99,5%. Se obtuvo un IAC medio de 65,2% en los casos con resultado positivo en ambas aproximaciones diagnósticas, de 73,0% para las muestras de casos con resultados positivos solo por detección directa y 83,6% para los casos negativos según ambos tipos de técnicas.

En la Tabla 9 se relacionan los resultados de los 27 casos positivos referidos en el apartado iv teniendo en cuenta el resultado de IgG y su índice de avidéz. Utilizando como valor de corte un 50% en el IA se pudieron establecer las posibles interpretaciones de cada uno de los casos de sarampión con IgM negativa.

El caso 1 presenta PCR positiva solo en una muestra, lo cual quizá indicaría una excreción baja del virus; con un título muy alto de IgG (18.325 UI/ml) de alta avidéz y tratándose de un corto tiempo de evolución (6 días) se clasificó como posible reinfección. El caso 2 al no poder medir el IA no se pudo interpretar. El paciente 3 presentaba una IgG de baja avidéz, y aunque había sido vacunado recientemente el genotipo encontrado era el del brote no el vacunal, así que se interpretó como una infección primaria con resultado falso negativo de la IgM. El caso 4, con 0 días de

evolución y un IA en el valor de corte podría ser una reinfección o una infección primaria con resultado falso negativo de la IgM. Los pacientes 5 y 8, con poco tiempo de evolución y título de IgG e IA bajos, se interpretaron como infecciones primarias con resultado falso negativo de la IgM. El caso 6 presenta una avidéz mayor del 50% tan solo con 2 días de evolución y un título moderado de IgG, lo que nos lleva a suponer que podría tratarse de una reinfección, aunque no puede descartarse la infección primaria con IgM falso negativo. Los casos 7 y 9, debido a su bajo tiempo de evolución, un título de IgG moderadamente alto y un IA en el valor de corte, presentan dos posibles interpretaciones como reinfecciones o infección primaria con resultado falso negativo de la IgM. Por último, el caso 10, el único positivo solamente por cultivo, se trata probablemente de un falso negativo de la PCR y la IgM dado el bajo IA. Sin embargo, la posibilidad de un aislamiento falso positivo no se puede descartar dada la cantidad de aislamientos de MeV que se produjeron en el momento de la inoculación de esta muestra de orina.

En lo que respecta a los casos con resultado IgG negativo, en 6 de ellos se daba un antecedente de vacunación reciente (1 a 13 días antes del comienzo, casos 11 y 17 al 21). De éstos, sólo el caso 18 fue confirmado como genotipo A a los 10 días del comienzo, genotipo que contiene todas las cepas vacunales. Por otra parte, las muestras recogidas más de 3 días después de la aparición del exantema (pacientes 23 al 26) se podrían clasificar como probables resultados falsos negativos de la IgM, ya que más del 88% de las muestras tomadas a los 4 días desde el comienzo dieron resultados IgM positivos, como se ve en la Figura 20. Los casos restantes fueron recogidos demasiado pronto para obtener un resultado IgM positivo.

<i>Caso</i>	<i>Edad</i>	<i>Tsint^a</i>	<i>Dosis(Tvac)^b</i>	<i>Cult Or^c</i>	<i>PCR S^c</i>	<i>PCR EF^c</i>	<i>PCR Or^c</i>	<i>IgG (UI/ml)^c</i>	<i>AV (%)^d</i>	<i>Genot</i>	<i>Interpretación^e</i>
1	27 a	6	DESC	N	N	P	N	18325	84	B3	Reinfección
2	30 a	1	1 d (9 días)	N	N	P	N	720	S.I.	B3	No interpretable
3	31 a	3	1 d (7 días)	P	N	P	P	700	25	B3	IP con F- IgM
4	24 a	0	1 d (13 a)	N	N	P	P	630	50	B3	Reinfección/ IP con F- IgM
5	22 a	2	DESC	N	N	P	N	290	34	B3	IP con F- IgM
6	21 a	2	DESC	N	N	P	P	2700	65	B3	Reinfección/ IP con F- IgM
7	22 a	3	DESC	Cont	P	P	P	3000	50	B3	Reinfección/ IP con F- IgM
8	25 a	3	DESC	P	P	P	P	400	33	B3	IP con F- IgM
9	34 a	4	DESC	N	N	P	N	1100	50	B3	Reinfección/ IP con F- IgM
10	5 a	9	2 d (1a 8m)	P	N	N	N	1297	54	B3	F+ cultivo/ IP con F- IgM
11	10 a	0	1 d (13 días)	P	P	P	P	N		B3	Recogida temprana
12	10 a	0	0 d	N	P	P	P	N		B3	Recogida temprana
13	13 a	0	1 d	N	P	P	P	N		B3	Recogida temprana
14	20 a	0	DESC	P	P	P	P	N		B3	Recogida temprana
15	5 m	1	0 d	P	P	P	P	N		B3	Recogida temprana
16	20 a	1	DESC	P	P	P	P	N		B3	Recogida temprana
17	27 a	2	1 d (10 días)	N	I	P	P	N		B3	Recogida temprana
18	34 a	2	1 d (10 días)	N	N	P	P	N		A	Vacunal
19	22 a	3	1 d (1 día)	Cont	P	P	P	N		B3	Recogida temprana
20	26 a	3	1 d (1 día)	P	P	P	P	N		B3	Recogida temprana
21	11 m	3	1 d (7 días)	N	P	P	P	N		B3	Recogida temprana
22	27 a	3	DESC	N	P	P	P	N		B3	Recogida temprana
23	25 a	4	0 d	P	P	P	P	N		B3	F- IgM
24	9 m	4	0 d	N	N	P	N	N		B3	F- IgM
25	20 a	4	DESC	P	P	P	P	N		B3	F- IgM
26	26 a	4	DESC	Cont	P	P	P	N		B3	F- IgM
27	23 a	DESC	1 d	P	P	P	P	N		B3	No interpretable

^a Tsint: días desde el comienzo del exantema a la recogida de la muestra. ^b Número de dosis vacunales (tiempo desde la administración al comienzo del exantema). DESC: desconocido. ^c P: positivo; N: negativo; Cont: contaminado; I: inhibido. ^d Resultado de avididad de la IgG específica para MeV. S.I.: Suero insuficiente. ^e IP: Infección primaria. F+: falso positivo; F-: falso negativo.

Tabla 9. Resultados en casos IgM negativa [94].

4. PCR, GENOTIPIFICADO Y DETECCIÓN DE IgM EN SANGRE SECA EN PAPEL DE FILTRO Y EXUDADO FARÍNGEO EN TAMPÓN DE LISIS.

4.1 Brote de sarampión en Guinea Ecuatorial en 2001.

En las 20 muestras recogidas se buscó ARN de MeV mediante la RT-PCR de exantemáticos, 14 muestras se ensayaron para IgM específica de MeV por ELISA indirecto y 15 para IgM específica de MeV por ELISA de captura de cadenas μ . El ensayo de ELISA indirecto incluyó pocillos de antígeno y de control de antígeno para cada muestra; los sueros que presentaban una diferencia de valores de absorbancia frente al patrón de referencia mayor de 0,20 se consideraron positivos, indeterminados si el valor de la diferencia se situaba entre 0,10 y 0,20 y negativos si estaba por debajo de 0,10. En el ensayo de captura el valor umbral se estableció como la "absorbancia media de tres determinaciones del control negativo multiplicada por 3", estableciéndose un rango de indeterminación de $\pm 20\%$.

En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos en 20 muestras de sangre seca sobre papel de filtro procedentes de Guinea Ecuatorial. Por la técnica de ELISA indirecto, 4 muestras resultaron positivas, 4 equívocas y 4 negativas, mientras que las 2 restantes presentaban un resultado no interpretable, ya que se obtuvieron altos valores de absorbancia en los pocillos de control de antígeno. Ambos resultados, positivo y equívoco, indican una infección reciente con virus MeV [145, 146], de forma que la sensibilidad del ELISA indirecto fue del 57,1%. En lo que respecta al ensayo de captura, 11 muestras fueron positivas, 2 equívocas y 2 negativas, por tanto la sensibilidad fue del 86,7%.

Utilizando la PCR de exantemáticos se detectó ARN de MeV en un 40% de las muestras y ADN de B19V en una (caso 6, Tabla 10) positiva a IgM de MeV según el ensayo de captura. Sin embargo, esta muestra fue negativa cuando se ensayó con un ELISA de captura de cadenas μ específico para IgM frente a B19V. El paciente presentaba infección por *Plasmodium falciparum* y falleció unos días más tarde. La secuenciación del fragmento de 456 pares de bases de la región variable del gen N mostró que los casos pertenecían al genotipo B3 en las muestras 7 y 19 [147], que es uno de los genotipos encontrados en África Central y Occidental [148-151].

<i>Nº. Muestra</i>	<i>Edad</i>	<i>PCR MeV</i>	<i>EIA IgM MeV IND</i>	<i>EIA IgM MeV CAP</i>
1	21 m	Pos	Equiv	Pos
2	3 m	Pos	Pos	Pos
3	DESC	Neg	Neg	Neg
4	3 a	Neg	Pos	Pos
5	DESC	Pos	Equiv	Pos
6	5 a	Neg	RNI	Equiv
7	6 a	Pos	NH	NH
8	DESC	Neg	NH	NH
9	8 m	Neg	NH	NH
10	DESC	Neg	Equiv	Equiv
11	DESC	Neg	NH	NH
12	7.5 a	Pos	Neg	Pos
13	14 m	Neg	Pos	Pos
14	5 a	Pos	NH	NH
15	4 m	Neg	Pos	Pos
16**	1 a	Neg	RNI	Pos
17*	7 a	Pos	Neg	Pos
18*	7 a	Neg	Neg	Pos
19	9 m	Pos	Equiv	Pos
20	6 m	Neg	NH	Neg
Positivos/total (%)		8 /20 (40%)	8/14 (57,1%)	13/15 (86,7%)

PCR MeV: PCR múltiple de exantemáticos. EIA MeV IND: ELISA indirecto para detección de IgM de MeV. EIA MeV CAP: ELISA de captura de cadenas μ para detección de IgM de MeV. RNI: Resultado no interpretable. DESC: desconocido. NH: No hecho.
 *Muestras del mismo paciente. **Paciente B19V positivo por PCR de exantemáticos.

Tabla 10. Resultados de IgM y PCR sobre sangre completa secada en papel de filtro, 2001.

4.2 Brote de sarampión en Guinea Ecuatorial en 2008.

En diciembre de 2008 se recibieron en el laboratorio de Aislamiento y Detección de Virus del Centro Nacional de Microbiología, desde Bata y Malabo (Guinea Ecuatorial), muestras de exudados faríngeos en tampón de lisis y sangre seca en papel Whatman de niños con sintomatología de sarampión. Los resultados de PCR sobre exudado faríngeo en tampón de lisis y sangre seca en papel Whatman, de ELISA indirecto en sangre seca en papel Whatman y del genotipo del virus se muestran en la Tabla 11. Todas las muestras de exudado faríngeo fueron positivas a MeV por PCR de exantemáticos. Y todas las muestras de sangre seca en papel de filtro fueron positivas a IgM específica de MeV excepto una, la cual se recogió tan sólo tres días después de la aparición de los síntomas. La PCR de exantemáticos en sangre seca en papel Whatman sólo detectó 3 positivos. El estudio del genotipo dio como resultado B3.

<i>Nº Muestra</i>	<i>Edad</i>	<i>Tiempo evolución fiebre</i>	<i>PCR MeV ExFar</i>	<i>PCR MeV Papel Whatman</i>	<i>EIA IgM MeV Ind Papel Whatman</i>	<i>Genotipo MeV ExFar</i>
<i>M1</i>	3 a	7	Pos	Neg	Pos	
<i>M2</i>	2 a	7	Pos	Neg	Pos	B3
<i>M3</i>	3 a	6	Pos	Neg	Pos	B3
<i>M4</i>	2 a	5	Pos	Neg	Pos	B3
<i>M5</i>	3 a	4	Pos	Neg	Pos	
<i>M6</i>	3 a	9	Pos	Neg	Pos	B3
<i>M7</i>	2 a	15	Pos	Neg	Pos	B3
<i>M8</i>	8 m	5	Pos	Pos	Pos	B3
<i>M9</i>	22 m	6	Pos	Neg	Pos	
<i>M10</i>	8 m	3	Pos	Pos	Neg	B3
<i>M11</i>	2 a	6	Pos	Neg	Pos	B3
<i>M12</i>	6 a	6	Pos	Neg	Pos	
<i>M13</i>	3 a	6	Pos	Neg	Pos	B3
<i>M14</i>	15 m	5	Pos	Neg	Pos	B3
<i>M15</i>	15 m	7	Pos	Neg	Pos	
<i>M16</i>	11 m	5	Pos	Pos	Pos	
<i>M17</i>	7 m	4	Pos	Neg	Pos	
<i>M18</i>	3 a	3	Pos	Neg	Pos	
<i>M19</i>	4 m	15	Pos	Neg	Pos	
<i>B1</i>	18 m	4	Pos	Neg	Pos	B3
<i>B2</i>	7 m	6	Pos	Neg	Pos	B3
<i>B3</i>	6 m	15	Pos	Neg	Pos	B3
<i>B4</i>	7 a	6	Pos	Neg	Pos	B3
<i>Positivos/Total (%)</i>			23/23 (100%)	3/23 (13%)	22/23 (95,6%)	

PCR MeV: PCR múltiple de exantemáticos. EIA MeV IND: ELISA indirecto para detección de IgM de MeV. EIA MeV CAP: ELISA de captura de cadenas μ para detección de IgM de MeV. ExFar: exudado faríngeo.

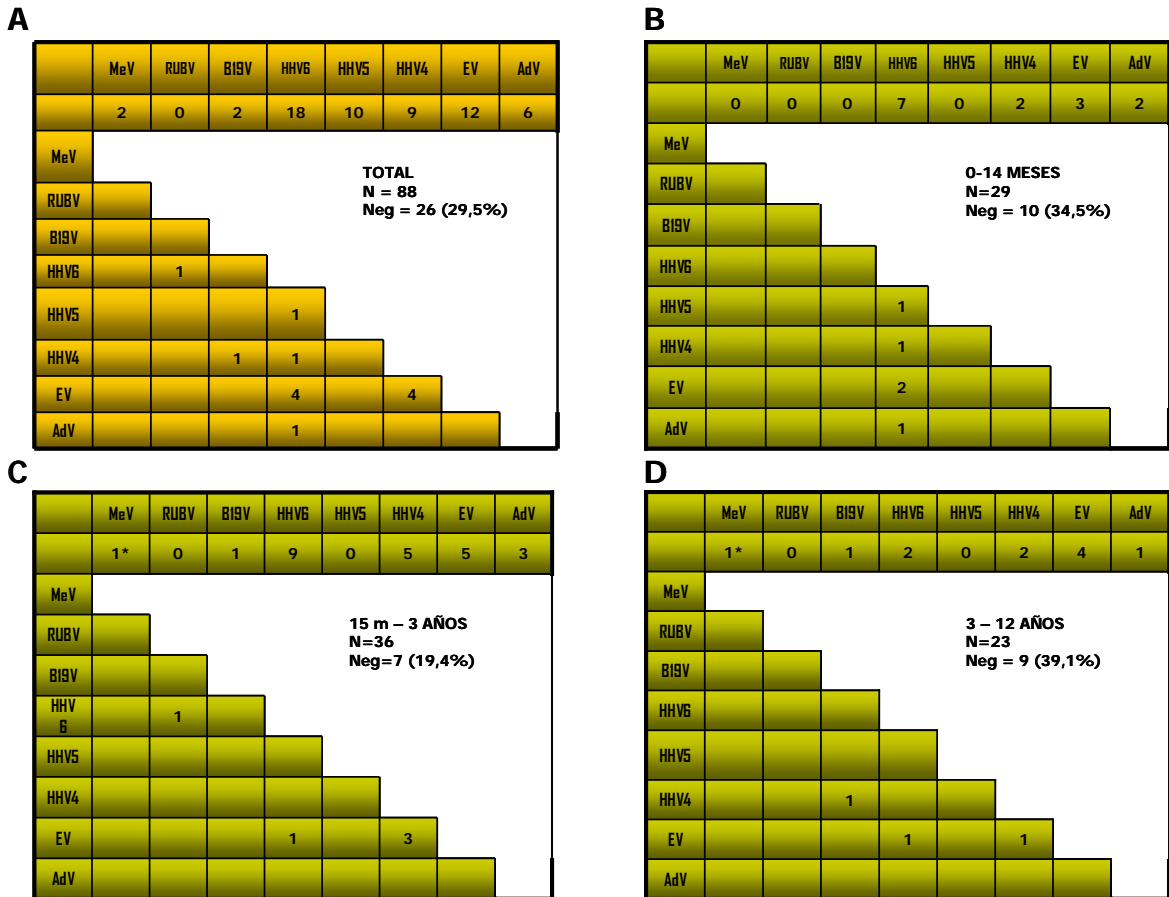
Tabla 11. Resultados de IgM y PCR sobre sangre completa secada en papel de filtro, 2008.

5. ESTUDIO DE EXANTEMA VÍRICO INFANTIL EN EL CONTEXTO DE UNA ALTA COBERTURA DE VACUNACIÓN CON TRIPLE VÍRICA.

De los 88 pacientes que presentaron exantema se detectaron 62 (70,5%) con evidencias de infección por algún virus de acuerdo a los criterios manejados, según la distribución que sigue: 26 infecciones por HHV-6 (34,7%), 20 por EV (26,7%), 15 por HHV-4 (20,0%), 7 por AdV (9,3%), 3 por B19V (4,0%), 2 por MeV (2,7%), 1 por HHV-5 (1,3%) y 1 por RUBV (1,3%), lo que significa 75 infecciones por algún virus en los 62 pacientes en el momento de la extracción de las muestras, ya que 13 infecciones fueron dobles (17,3%). El gráfico A de la Figura 21 muestra el total de pacientes positivos, el gráfico B incluye los niños de 0 a 14 meses, el C ilustra los

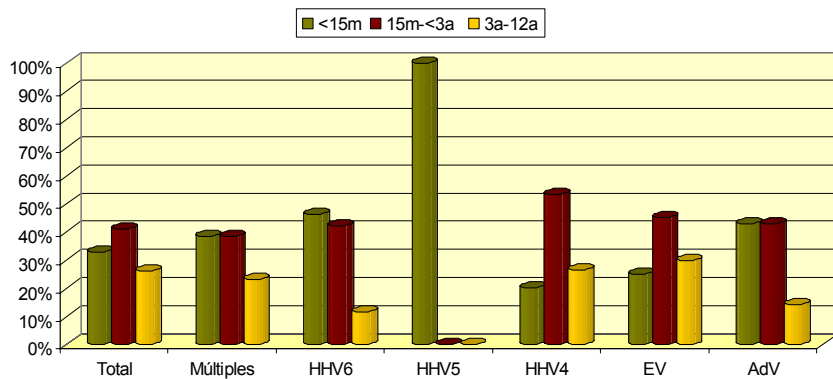
pacientes de 15 meses a 3 años (3 años no incluidos) y el D presenta los niños de 3 a 12 años (3 años incluidos). En los cuatro gráficos se indica el número de pacientes negativos. El porcentaje de infecciones según la edad se muestra en la Figura 22.

Figura 21. Número de infecciones por edad incluyendo infecciones dobles y la única triple.



*Casos de sarampión vacunal.

Figura 22. Porcentaje de infecciones por edad.



En lo que se refiere al aislamiento de virus, se realizó en 20 muestras de exudado faríngeo correspondientes a 20 pacientes basándose en los resultados de las técnicas de PCR. Cinco presentaban PCR positiva a AdV, 12 pacientes eran positivos a EV, 2 eran positivos a EV y HHV-4 y, por último, otro era positivo a HHV-6 por la misma técnica. De las 20 inoculaciones 11 resultaron positivas a EV y 3 a AdV, todas ellas coincidentes con los resultados de PCR.

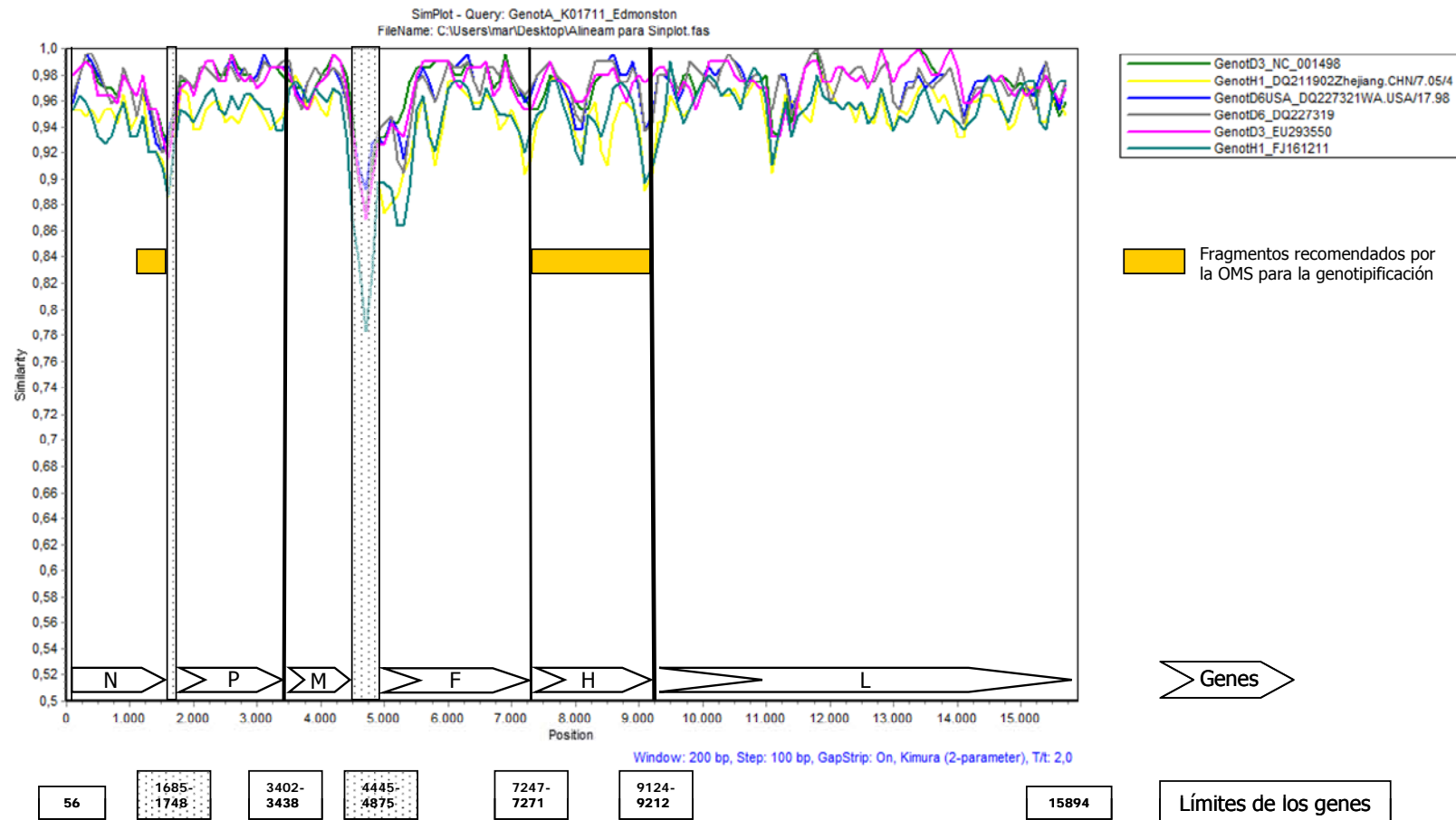
En los dos casos en los que se detectó sarampión por PCR se trataba de un niño y una niña, ambos de 15 meses, con antecedente de vacunación 6 y 8 días antes de la aparición de los síntomas respectivamente. En el caso de la niña se pudo comprobar por genotipificado que se trataba del genotipo A que contiene la cepa vacunal usada en España, mientras que en el caso del niño no fue posible genotipificarlo. El único caso detectado de RUBV aparece como una infección doble junto con HHV-6, el paciente tenía 16 meses de edad y había sido vacunado 34 días antes del comienzo del exantema, con lo cual es de suponer que la IgM detectada represente IgM residual debida a la vacunación, siendo el HHV-6 el causante del exantema.

6. DESARROLLO DE UNA PCR PARA GENOTIPIFICADO DEL VIRUS DEL SARAMPIÓN

6.1 Diseño de los iniciadores o “primers”.

El diseño de los iniciadores se llevó a cabo de forma que permitieran la detección del fragmento hipervariable de 450 nucleótidos del extremo COOH del gen N, que presenta una variabilidad del 12% entre cepas salvajes del virus, siguiendo las recomendaciones de la OMS [21]. Como puede observarse en el gráfico de similaridad (Figura 23), creado con el programa SimPlot v3.5.1 (Stuart C. Ray, División de Enfermedades Infecciosas, Departamento de Medicina, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, EEUU) en base a las secuencias completas de MeV encontradas en GenBank, el fragmento recomendado por la OMS no corresponde a los más variables del genoma viral, situados en los genes M y F, aunque sí que presenta una variabilidad similar e incluso algo superior a la del gen de la hemaglutinina, que es el segundo fragmento recomendado por la OMS para genotipificación.

Figura 23. Gráfico de similitud entre secuencias completas del genoma de los genotipos D3, D6 y H1 respecto a la secuencia K01711 de genotipo A. Los límites de los genes se refieren a la secuencia DQ227321.



Para el diseño de los iniciadores de la PCR de genotipificado de MeV se obtuvieron secuencias del genoma completo del virus del sarampión y del virus del moquillo del perro (CDV) en la base de datos GenBank, las cuales fueron alineadas mediante la aplicación MegAlign del paquete informático DNASTAR (Lasergene, DNASTAR, Inc., Madison, WI, EEUU). Sobre estos alineamientos se diseñaron los iniciadores siguiendo criterios similares a los descritos en la sección 1.1 para la PCR múltiple de exantemáticos. El tamaño del fragmento conseguido fue de 700 pb. En este caso los iniciadores se diseñaron para ser capaces, no solo de amplificar diversas cepas del virus del sarampión, sino incluso también de CDV, un virus diferente del mismo género, lo cual convierte en poco probable la existencia de cepas de MeV de secuencia desconocida con desapareamientos en el extremo 3' o posiciones adyacentes que pudiesen evitar la amplificación. Los iniciadores de primera reacción de PCR de genotipificado de MeV se denominaron GSAR1F ("sense"), situado entre los nucleótidos 1067 y 1088 y GSAR1R ("antisense"), emplazado en 1862-1844; mientras que los de la segunda reacción anidada o "nested" se denominaron GSAR2F ("sense"), ubicado en 1127-1148; GSAR2R ("antisense"), constituido por las posiciones entre los nucleótidos 1827 y 1808 (Figura 24). Las posiciones de los iniciadores se refieren a la cepa Edmonston cuyo número de acceso en la base de datos GenBank es K01711 (X16565). Estos iniciadores fueron sintetizados por Sigma-Genosys Ltd. (Cambridgeshire, UK).

Figura 24. Iniciadores de MeV para PCR de genotipificado.

GSAR1F	5'T	T	C	A	R	A	A	C	A	A	R	T	T	Y	A	G	T	G	C	A	G	G3'
SecA×20	G	G	.	.	T
SecB×4*	A	A	.	.	C
SecC×1*	G	A	.	.	C
GSAR1R	5'G	R	G	C	C	C	G	G	A	K	G	C	A	T	T	C	C	A	G3'			
Alineam.	3'C	T	G	G	A	A	T	G	C	M	T	C	C	G	G	G	C	Y	C5'			
SecA×18	A	.	.	.	A	.	.	.	T.	.			
SecB×5*	C	.	.	A	A	.	.	.	C	.			
SecC×2	A	C	.			
GSAR2F	5'G	A	G	T	G	G	A	A	C	T	T	G	A	A	A	A	C	T	C	C	A	T3'
SecA×20
SecB×5*	.	T	.	.	T

GSAR2R	5' C	G	T	G	C	C	T	G	Y	T	C	Y	T	C	T	G	C	C	A	T3'
Alineam.	3' A	T	G	G	C	A	G	A	R	G	A	R	C	A	G	G	C	A	C	G5'
SecA×20	A	.	.	G
SecB×4*	G	.	.	A	C	T	A
SecC×1*	G	.	.	G	C	T	A

K: G o T; R: A o G; M: A o C; Y: T o C; *Secuencias que corresponden a CDV (*Canine distemper virus*).
 Secuencias utilizadas para el diseño: X16565, Z66517, E04903, NC001498, S58435, X16566, X16569, X16567, X16568, AB046218, AF266291, AF266290, AF266289, AF266288, AF266287, AF266286, AB032167 (complementaria), AB012948 (complementaria), AB012949 (complementaria), CDV1= AF378705, CDV2= NC_001921, CDV3= AF305419, CDV4= AF164967, CDV5= AF014953.

6.2 Ajuste de parámetros de primera reacción de PCR.

Se llevó a cabo una única reacción de retrotranscripción-amplificación con el equipo Access RT-PCR System (Promega, Madison, WI, EEUU) [36].

Fue necesario realizar varios experimentos dirigidos al ajuste de diversos parámetros utilizando dos diluciones distintas de un extracto de ARN del virus cultivado a partir de la vacuna, denominadas A (alta concentración vírica) y B (baja concentración vírica). Puesto que los productos de la primera reacción no se apreciaban directamente en un gel fue necesario realizar la segunda reacción con unas condiciones fijas de amplificación para poder visualizar los resultados de la variación de las condiciones de la primera reacción. La estandarización de la concentración de SO₄Mg, desoxinucleótidos trifosfato e iniciadores y las temperaturas más adecuadas de hibridación y de desnaturalización se pueden observar en las Figura 25 a la Figura 28.

Figura 25. Estandarización de la concentración de SO₄Mg. A y B: concentración alta y baja de MeV respectivamente. 1-6: concentración de SO₄Mg (mM).

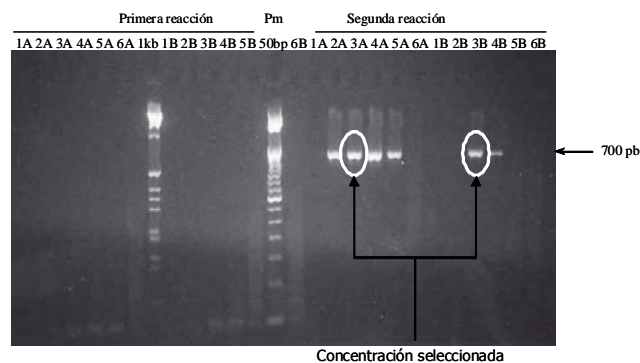


Figura 26. Estandarización de la concentración de desoxinucleótidos trifosfato e iniciadores. 22: dilución de 200 μ M dNTPs y 0,2 μ M de iniciadores; 25: dilución de 200 μ M dNTPs y 0,5 μ M de iniciadores; 210: dilución de 200 μ M dNTPs y 1 μ M de iniciadores, 52: dilución de 500 μ M dNTPs y 0,2 μ M de iniciadores; 55: dilución de 500 μ M dNTPs y 0,5 μ M de iniciadores, 510: dilución de 500 μ M dNTPs y 1 μ M de iniciadores; 102: dilución de 1000 μ M dNTPs y 0,2 μ M de iniciadores; 105: dilución de 1000 μ M dNTPs y 0,5 μ M de iniciadores y 1010: dilución de 1000 μ M dNTPs y 1 μ M de iniciadores.

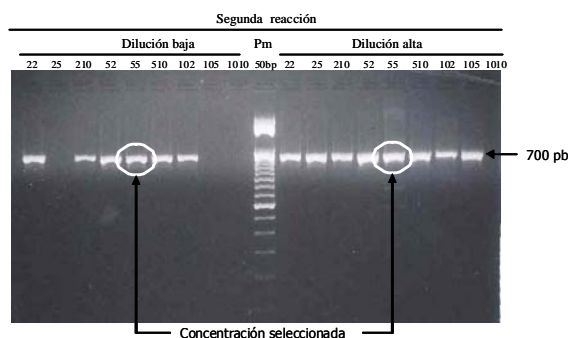


Figura 27. Estandarización de la temperatura de hibridación: 45, 50, 55 y 60°C.

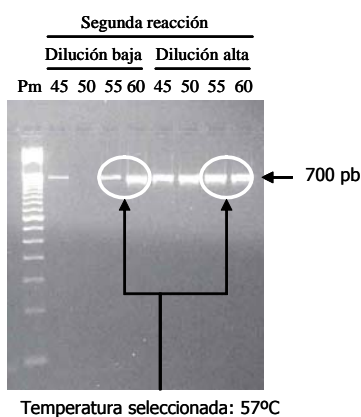
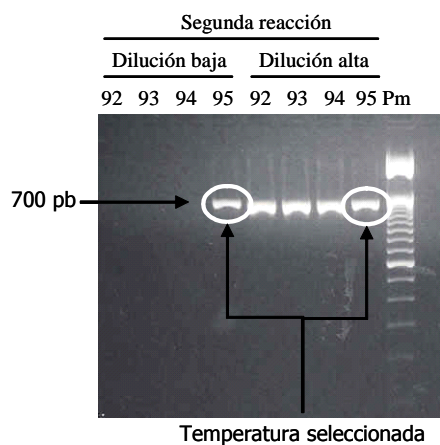
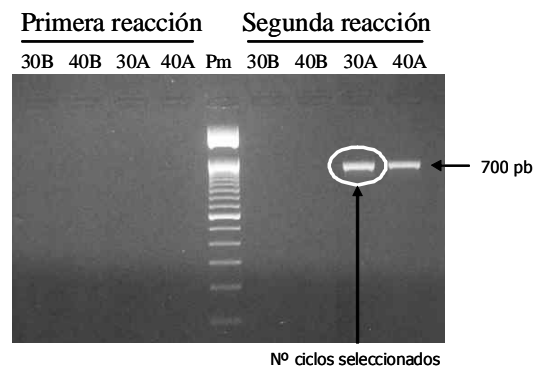


Figura 28. Estandarización de la temperatura de desnaturalización: 92, 93, 94 y 95°C.



En este caso también se realizó una prueba para determinar el número de ciclos de amplificación apropiados, 30 ó 40 con dos diluciones de virus, alta y baja, puesto que se quería comprobar si la banda de primera reacción se podía detectar aumentando el número de los mismos; sin embargo, como se observa en la Figura 29, la extensión a 40 ciclos no aportaba una mejora en la sensibilidad.

Figura 29. Determinación del número de ciclos de la primera reacción.



Los experimentos anteriores determinaron las siguientes condiciones para realizar la primera reacción de la RT-PCR de genotipificado de MeV. A una mezcla de PCR conteniendo 3mM de $MgSO_4$, 500 μM de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 10 μl de tampón AMV/Tf15x, 5 U de transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar, 5 U de la polimerasa de *Thermus flavus* (todos ellos componentes del equipo comercial Access RT-PCR System de Promega, Madison, WI, EEUU) y 0,5 μM de iniciadores de primera reacción (GSAR1F y GSAR1R, Figura 24) se añadieron 5 μl de extracto hasta un volumen final de 50 μl . El termociclador PTC-200 Peltier (MJ Research, Watertown, MA) se programó con 45 min a 48°C para la RT y 2 min a 94°C para la desactivación de la transcriptasa inversa y la desnaturalización del ADNc, seguido por 30 ciclos de 1 min de desnaturalización a 95°C, 1 min de hibridación a 57°C y 1 min de elongación a 72°C. En el último ciclo la elongación se prolongó durante 5 min [36].

6.3 Ajuste de parámetros de segunda reacción de PCR o anidada.

La estandarización de la segunda reacción se llevó a cabo efectuando una serie de

experimentos similares a los de la primera reacción, que se muestran en las Figura 30 a la Figura 33 con el propósito de establecer las mejores condiciones para detectar la banda de 700 pb necesaria para la secuenciación y determinación del genotipo del virus.

Figura 30. Estandarización de la concentración de Cl_2Mg . 1-6: concentración de Cl_2Mg (mM)

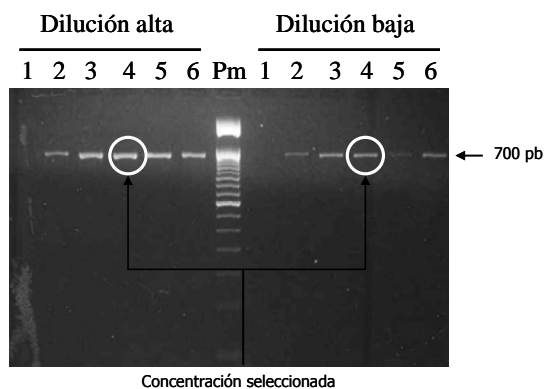


Figura 31. Estandarización de la concentración de desoxinucleótidos trifosfato e iniciadores. 22: dilución de 200 μM dNTPs y 0,2 μM de iniciadores; 25: dilución de 200 μM dNTPs y 0,5 μM de iniciadores; 210: dilución de 200 μM dNTPs y 1 μM de iniciadores, 52: dilución de 500 μM dNTPs y 0,2 μM de iniciadores; 55: dilución de 500 μM dNTPs y 0,5 μM de iniciadores, 510: dilución de 500 μM dNTPs y 1 μM de iniciadores; 102: dilución de 1000 μM dNTPs y 0,2 μM de iniciadores; 105: dilución de 1000 μM dNTPs y 0,5 μM de iniciadores y 1010: dilución de 1000 μM dNTPs y 1 μM de iniciadores.

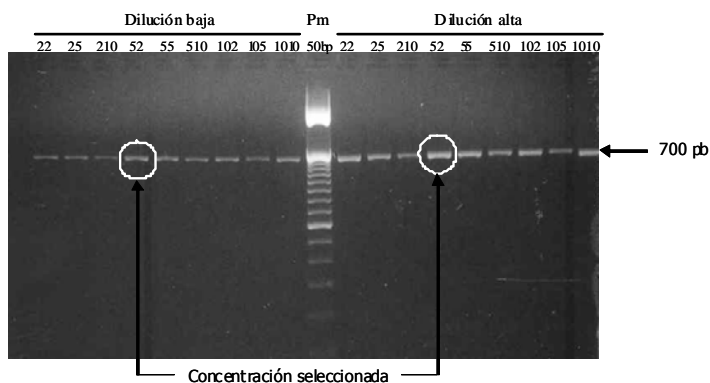


Figura 32. Estandarización de la temperatura de hibridación: 50, 55, 60 y 65°C.

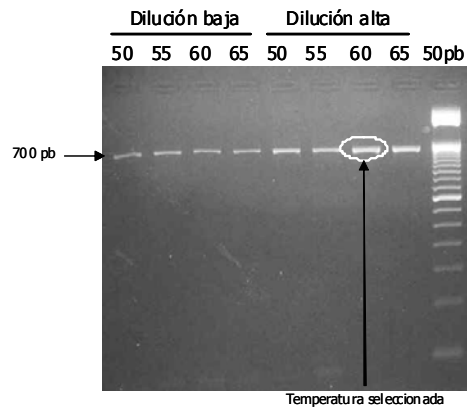
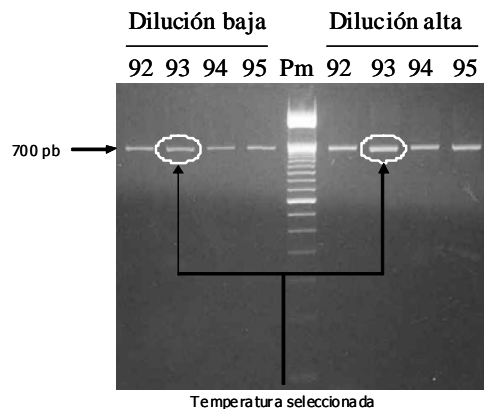


Figura 33. Estandarización de la temperatura de desnaturalización: 92, 93, 94 y 95°C.



Una vez comprobadas las condiciones, en la reacción anidada se añadió 1 µl del producto de la primera reacción a 49 µl de una mezcla de PCR que contenía 4 mM de MgCl₂, 500 µM de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 0,2 µM de cada uno de los iniciadores de segunda reacción (GSAR2F y GSAR2R, Figura 24), 5 µl de tampón II de PCR 10x (Roche Molecular Systems, Inc.) y 0,25 U de Taq DNA polimerasa (Amplitaq DNA Polymerase, Roche Molecular Systems, Inc.). El programa de temperaturas consistió en un primer ciclo de 2 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de: 1 min de desnaturalización a 93°C, 1 min de hibridación a 60°C, y 1 min de elongación a 72°C. La elongación se prolongó 5 min en el último ciclo.

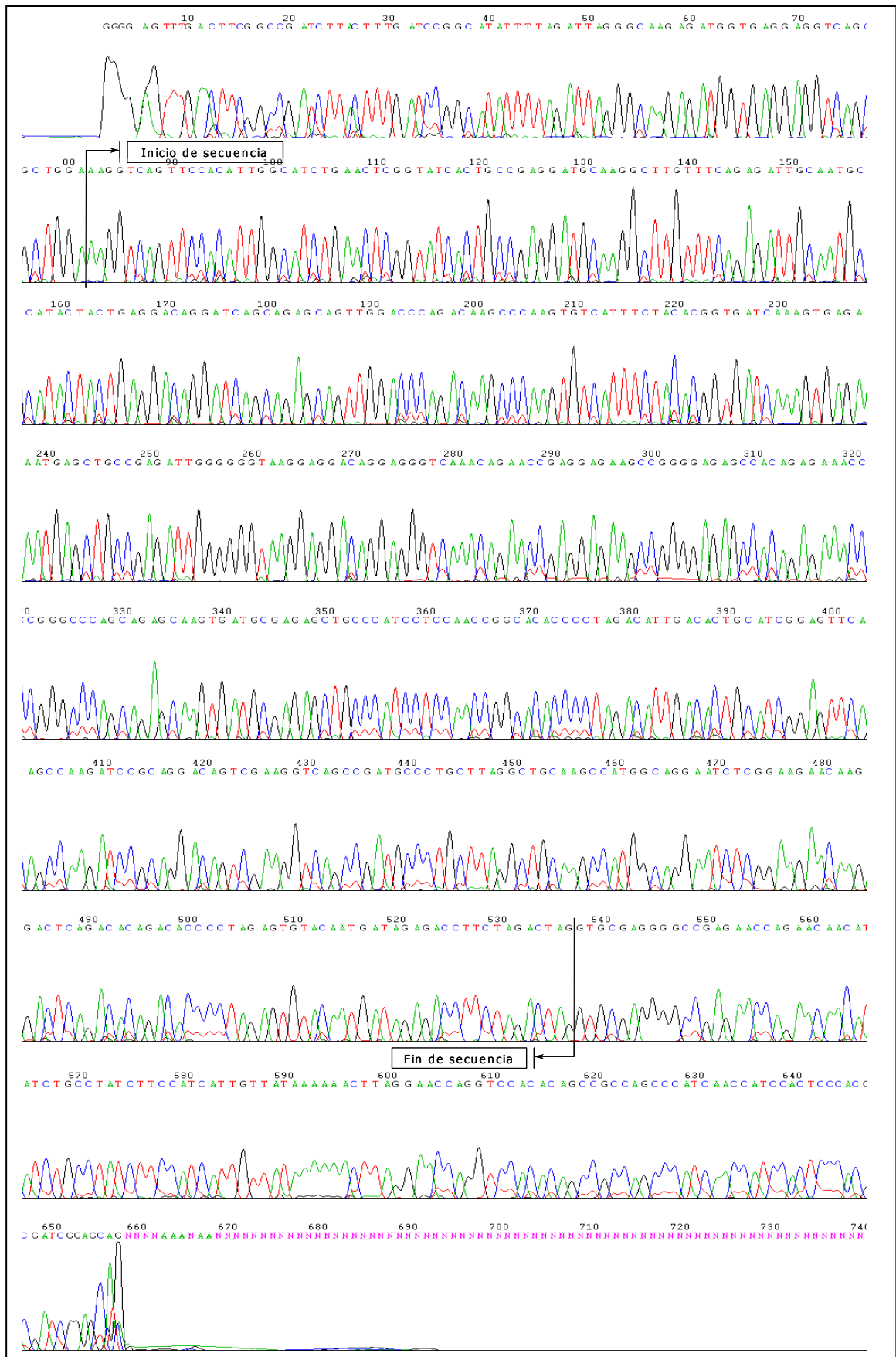
Los productos de la PCR fueron visualizados bajo luz UV, mediante electroforesis en

gel de agarosa al 2%, el cual contenía 0,5 µg de bromuro de etidio por ml en tampón Tris-borato-EDTA. El tamaño de la banda esperada era de 700 pb. No se añadió un control interno a la RT-PCR de genotificado de MeV para que no interfiriera en la secuenciación del fragmento obtenido. Las muestras que no mostraban banda se repitieron y si seguían sin mostrarla se asumía que eran no genotificables [36].

6.4 Secuenciación.

La reacción de secuenciación se llevó a cabo en ambas cadenas de ADN tal y como se ha descrito en la sección 4.5 de Material y Métodos. (Figura 34).

Figura 34. Cromatograma de una secuencia de MeV obtenida con ABI PRISM 3700.



6.6 Análisis de la secuencia.

Utilizando la secuencia consenso obtenida a partir de ambas cadenas de ADNc se realizaron los alineamientos múltiples que se indican más abajo con la metodología ya descrita en la sección 4.6 de Material y Métodos. Seguidamente se realizó el análisis de las distancias genéticas entre secuencias y se llevó a cabo el análisis filogenético de la homología encontrada por el método Neighbor-Joining (Kimura 2 parámetros), usando 1000 replicaciones de "bootstrap" para obtener árboles filogenéticos gracias a los cuales se asignó el genotipo a nuestras secuencias problema.

Primero se analizaron las secuencias obtenidas desde enero de 2001 a diciembre de 2008 junto con las de referencia de la OMS [23], para determinar a que genotipo pertenecían (Figura 36). En segundo lugar, se genotipificó cada secuencia encontrada en la base de datos GenBank sin asignación a genotipo, siguiendo el mismo método (no mostrado) y, finalmente, se hicieron árboles individuales de cada genotipo con las secuencias españolas del periodo enero del año 2001 a diciembre del 2008, las correspondientes de las bases de datos que fueron clasificadas como pertenecientes al mismo genotipo y las secuencias de referencia (Figura 39 a la Figura 49).

7. GENOTIPOS DE MeV ENCONTRADOS EN ESPAÑA, 2001-2008

Durante el período de tiempo del estudio, se han detectado once genotipos diferentes en forma de casos esporádicos o de brotes, sin que exista en ningún momento un único genotipo predominante (Tabla 12, Figura 35). Se puede observar que el genotipo D7 detectado entre los años 2001 al 2003 interrumpió su circulación, de la misma forma que ocurrió con el genotipo C2 que se detectó durante los años 2002 al 2004, y no volvieron a producir casos en España posteriormente. Por otro lado, se advierte la aparición de genotipos como B3 y D4 que se han ido detectando de forma intermitente a lo largo de los últimos años y que también se detectaron en nuestro entorno, Europa o África, en la misma época. Sin embargo, el genotipo D6, que causó grandes brotes en Europa del Este en 2006, fue importado con frecuencia en ese mismo año, para no volver a detectarse con posterioridad. Según la

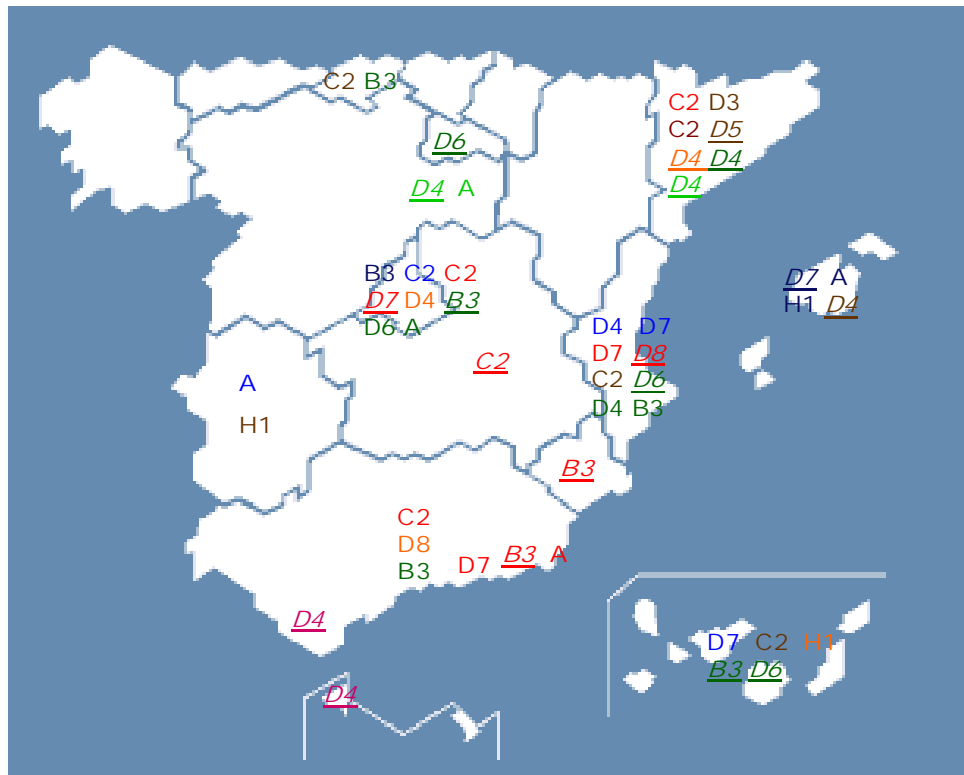
información disponible la mayoría de los brotes, y algunos casos esporádicos de los que se conoce el origen, han sido importados desde países de África, Asia o Europa. Es de destacar la aparición de brotes de más de 50 casos como el de Madrid del año 2006 causado por el genotipo B3 y el de Barcelona en 2006-2007 por genotipo D4 cuyo origen se encontró en países europeos, Reino Unido e Italia respectivamente, donde también produjeron brotes con un número considerable de casos [152-154]. Por otra parte genotipos como D3, H1 o D5 se han encontrado en casos esporádicos o como brotes de menos de 10 casos.

CCAA	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Madrid	B3(GEC)	C2(Desc)	C2(MAR) D7(Desc)	C2(Desc)	D4(GBR)	B3(GBR) B3(ETI,MAR) D6(UCR) A		D4(Cad) B3(Desc) D5(Desc)
I. Baleares	D7(Desc) A H1(CHI)			D4(Desc)				
C. Valenciana		D7(RUM) D4(UCR)	D8(Desc) D7(Desc)	C2(Desc)		B3(Mad) D6(UCR) D4(Desc)		A
Extremadura		A		H1(CHI)				
Andalucía			B3(ARG) A C2(MAR) D7(Desc)	A	D8(Desc)	B3(Desc)		D4(Desc) D9(Desc) A
I. Canarias		D7(ALE)		C2(Desc)	H1(Desc)	B3(GBR) D6(ALE)		
Cataluña			C2(Desc) D3(Desc)	C2(Desc) D5(TAI, Desc)	D4(RUM)	D4(ITA) D4(RUM)	D4 (ITA)	
Cantabria				C2(Desc)		B3(Mad)		
Murcia			B3(Alm)					
Castilla-La Mancha			C2(MAR)					
La Rioja						D6(Desc)		
Castilla y León							D4(Bcn)	
Ceuta								D4(Desc)

*GEC: Guinea Ecuatorial. Desc: origen desconocido. CHI: China. RUM: Rumania. UCR: Ucrania. ALE: Alemania. MAR: Marruecos. ARG: Argelia. Alm: Almería. TAI: Tailandia. GBR: Gran Bretaña. ETI: Etiopía. ITA: Italia. Mad: Madrid. Bcn: Barcelona. Cad: Cádiz.

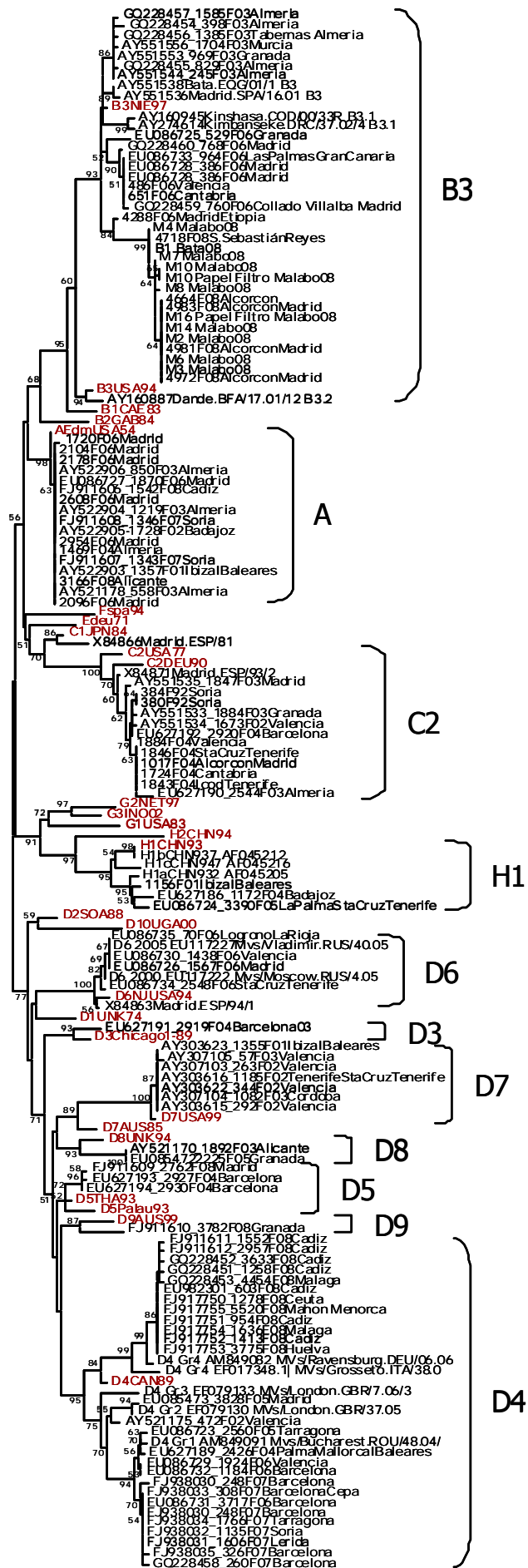
Tabla 12. Genotipos de MeV encontrados en España en el período 2001-2008. La procedencia del caso índice se indica entre paréntesis. Los casos esporádicos se presentan en color azul y los brotes en color rojo.

Figura 35. Genotipos detectados en España en el periodo 2001-2008 por Comunidad Autónoma. Cada color corresponde a un año diferente y los genotipos que produjeron brotes están subrayados y en cursiva. Código de colores: 2001, 2002, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, *Brotes*.



La Figura 36 muestra los genotipos encontrados en España comparándolos con las cepas de referencia establecidas por la OMS, en color rojo (Tabla 1). Se puede observar que según el criterio de asignación de genotipo establecido los casos de D5 y D9 no se sostienen con una frecuencia de aparición del clado en las réplicas del árbol (bootstrap) de 90 o mayor. Para resolver la asignación de genotipo en estos casos, recurrimos al criterio de homología de secuencia nucleotídica entre las secuencias encontradas en nuestro país y las diferentes secuencias de referencia (Figura 37 y Figura 38). En todos los casos, la secuencia de referencia más parecida a la problema en términos de homología se correspondió a la más próxima en el árbol.

Figura 36. Filograma de secuencias encontradas en España en el periodo enero 2001-diciembre 2008 y secuencias de referencia de cada genotipo. El nombre de la secuencia incluye el número de acceso a la base de datos GenBank, el número de muestra, el año y la localidad. Por ejemplo, el caso GQ228457_1585F03Almería tiene número de acceso a GenBank GQ228457, número de muestra 1585F y se produjo en el año 2003 en Almería. Las secuencias españolas están coloreadas en negro y las de referencia en rojo. En la figura solo se muestran los valores de "bootstrap" mayores de 49.



El porcentaje de divergencia entre las secuencias D5 encontradas en nuestro país y la secuencia de referencia de ese genotipo designada por la OMS (Tabla 1) no supera el 2,5% (Figura 37, de 0,9 a 2,2%) designado por la Organización como necesario para la definición de un nuevo genotipo en base a la parte hipervariable del gen de la nucleoproteína [22] corroborando la asignación de las secuencias EU627193_2927F04 Barcelona, EU627194_2930F04 Barcelona y FJ911609_2762F08 Madrid a dicho genotipo.

En lo que se refiere a la secuencia FJ911610_3782F08 Granada de genotipo D9, en la Figura 38 se aprecia que el porcentaje de divergencia con la secuencia de referencia es de 3,2%, lo cual superaría lo establecido por la OMS para definir un nuevo genotipo si no tuviéramos en cuenta que tanto el genotipo D9 como el G3 fueron aceptados como tales porque han permitido definir la características genéticas de virus salvaje en áreas con sarampión endémico y han ayudado a describir brotes. Así, ambos se establecieron como nuevos genotipos por su utilidad epidemiológica [23].

Figura 37. Distancias por pares de Clustal W (Equilibrado) entre los genotipos de referencia de MeV y las secuencias españolas de genotipo D5.

		PORCENTAJE DE SIMILITUD																														
		A	B1	B2	B3N	B3U	C1	C2U	C2D	D1	D2	D3	D4	D5B	D5T	D6	D7A	D7U	D8	D9	D10	E	F	G1	G2	G3	H1	H2	EU627194	EU627193	FJ911609	
PORCENTAJE DE DIVERGENCIA	A		96.3	96.7	95.8	96.5	97.1	95.0	93.9	96.1	97.4	95.4	95.0	95.4	96.5	94.7	95.0	92.8	95.2	94.5	94.1	96.7	96.1	94.5	94.5	95.0	93.9	92.8	96.1	95.8	95.8	A
	B1	3.9		95.6	96.9	98.0	95.6	93.9	92.8	95.0	95.0	93.9	93.0	93.6	94.5	93.2	93.4	91.7	93.2	93.0	92.1	95.2	94.5	93.4	93.4	94.3	92.3	91.4	94.1	93.9	93.9	B1
	B2	3.4	4.6		95.6	95.8	95.2	93.4	91.9	94.1	95.4	93.4	93.0	93.6	94.5	93.6	93.0	91.2	92.8	92.5	92.5	95.2	94.1	92.5	93.0	93.0	92.3	90.8	94.1	93.9	93.9	B2
	B3N	4.3	3.2	4.6		98.0	95.4	93.4	92.8	94.1	94.5	93.4	92.5	93.2	94.1	92.8	93.4	91.2	93.0	92.5	92.3	94.7	94.3	92.5	92.5	93.0	91.9	91.0	93.6	93.4	93.4	B3N
	B3U	3.6	2.0	4.3	2.0		95.8	94.1	93.4	94.7	95.2	94.1	93.2	93.9	94.7	93.0	94.1	91.9	93.4	93.2	92.3	95.4	94.7	93.2	93.2	93.6	92.1	91.2	94.3	94.1	94.1	B3U
	C1	2.9	4.6	5.0	4.8	4.3		96.1	95.0	95.4	95.8	94.3	94.7	94.7	95.8	94.1	94.3	92.1	94.1	93.9	94.3	96.9	95.8	93.9	94.5	95.0	93.2	92.3	95.4	95.2	95.2	C1
	C2U	5.3	6.5	7.0	7.0	6.2	4.1		98.0	93.2	94.1	93.0	92.5	93.0	94.1	91.9	93.4	91.2	92.3	92.1	91.2	94.3	93.6	91.9	92.3	92.8	90.8	89.9	93.6	93.4	93.4	C2U
	C2D	6.5	7.7	8.7	7.7	7.0	5.3	2.0		92.3	93.2	92.5	91.7	92.1	93.2	91.0	92.1	90.8	91.4	91.2	90.4	93.2	92.5	90.8	91.2	91.7	89.7	88.8	92.8	92.5	92.5	C2D
	D1	4.1	5.3	6.2	6.2	5.5	4.8	7.2	8.2		96.9	95.8	95.4	96.1	96.5	95.6	95.8	93.9	95.2	95.0	94.5	95.0	94.7	93.9	93.4	93.9	93.0	92.1	96.1	95.8	95.8	D1
	D2	2.7	5.3	4.8	5.8	5.1	4.3	6.2	7.2	3.2		96.7	96.3	96.7	97.4	95.6	96.3	94.1	96.3	95.8	95.8	95.4	94.7	93.6	93.6	94.1	93.6	93.2	96.9	96.7	96.7	D2
	D3	4.8	6.5	7.0	7.0	6.3	6.0	7.5	8.0	4.3	3.4		96.1	96.9	97.6	94.5	96.5	94.3	95.8	96.1	93.4	93.9	93.6	92.5	92.1	92.5	92.3	91.2	97.1	96.9	96.9	D3
	D4	5.3	7.5	7.5	8.0	7.3	5.5	8.0	9.0	4.8	3.9	4.1		96.5	97.1	94.1	96.1	93.9	95.8	96.1	93.9	93.9	93.6	92.1	92.1	92.5	92.3	91.7	96.7	96.5	96.5	D4
	D5B	4.8	6.7	6.7	7.2	6.5	5.5	7.4	8.4	4.1	3.4	3.2	3.6		98.5	95.0	96.5	94.7	96.3	96.9	93.9	94.5	93.6	93.0	92.5	93.0	92.5	91.9	98.0	97.8	97.8	D5B
	D5T	3.6	5.8	5.8	6.3	5.5	4.3	6.2	7.2	3.6	2.7	2.5	2.9	1.6		95.8	97.1	95.0	96.9	97.1	94.5	95.4	94.7	94.1	93.6	94.1	93.2	92.3	99.1	98.9	98.9	D5T
	D6	5.5	7.2	6.7	7.8	7.5	6.2	8.7	9.7	4.5	4.6	5.8	6.3	5.3	4.3		94.1	92.3	94.3	94.1	93.2	94.3	93.2	91.9	92.8	92.8	91.4	90.6	95.2	95.0	95.0	D6
	D7A	5.3	7.0	7.5	7.0	6.3	6.0	7.0	8.4	4.3	3.9	3.6	4.1	3.6	2.9	6.2		96.1	96.3	95.6	93.4	93.9	93.6	92.5	92.1	93.0	93.2	91.4	96.7	96.5	96.5	D7A
	D7U	7.8	9.1	9.6	9.6	8.8	8.5	9.5	10.0	6.5	6.3	6.0	6.5	5.5	5.3	8.3	4.1		94.5	93.4	91.2	91.9	91.4	91.0	90.4	91.2	90.4	89.5	94.5	94.3	94.7	D7U
	D8	5.0	7.2	7.7	7.5	7.0	6.2	8.2	9.2	5.0	3.9	4.3	4.3	3.8	3.2	6.0	3.8	5.8		95.8	93.6	93.6	93.0	91.9	92.3	93.2	93.2	91.4	96.5	96.3	96.7	D8
	D9	5.8	7.5	8.0	8.0	7.3	6.5	8.5	9.5	5.3	4.3	4.1	4.1	3.2	2.9	6.2	4.6	7.0	4.3		93.0	93.4	93.6	92.5	92.1	92.5	92.1	91.4	96.7	96.5	96.5	D9
	D10	6.2	8.5	8.0	8.3	8.3	6.0	9.5	10.5	5.7	4.3	7.0	6.5	6.5	5.8	7.2	7.0	9.6	6.7	7.5		93.4	92.8	91.2	91.7	92.1	91.4	91.2	94.1	93.9	93.9	D10
E	3.4	5.0	5.0	5.5	4.8	3.1	6.0	7.2	5.2	4.8	6.5	6.5	5.7	4.8	6.0	6.5	8.8	6.7	7.0	7.0		95.0	93.9	93.4	93.9	92.8	92.1	95.4	95.2	95.2	E	
F	4.1	5.8	6.2	6.0	5.5	4.3	6.7	7.9	5.5	5.5	6.8	6.7	6.7	5.5	7.2	6.7	9.3	7.5	6.7	7.7	5.3		93.2	92.8	93.2	91.9	91.0	94.7	94.5	94.5	F	
G1	5.8	7.0	8.0	8.0	7.3	6.5	8.7	10.0	6.5	6.8	8.0	8.5	7.5	6.2	8.8	8.0	9.8	8.8	8.0	9.5	6.5	7.2		94.5	95.0	93.0	92.5	94.1	93.9	93.9	G1	
G2	5.8	7.0	7.5	8.0	7.3	5.7	8.2	9.5	7.0	6.7	8.5	8.5	8.0	6.7	7.7	8.5	10.6	8.2	8.5	9.0	7.0	7.7	5.8		97.4	93.6	92.3	93.2	93.0	93.0	G2	
G3	5.3	6.1	7.5	7.5	6.8	5.3	7.7	9.0	6.5	6.3	8.0	8.0	7.5	6.3	7.7	7.5	9.6	7.2	8.0	8.5	6.5	7.3	5.3	2.7		93.6	92.3	93.6	93.4	93.4	G3	
H1	6.5	8.3	8.2	8.8	8.5	7.2	10.0	11.3	7.4	6.7	8.2	8.2	7.9	7.2	9.2	7.2	10.6	7.2	8.5	9.2	7.7	8.7	7.5	6.7	6.7		94.5	92.8	92.5	92.5	H1	
H2	7.7	9.3	10.0	9.8	9.6	8.2	11.1	12.4	8.5	7.2	9.5	9.0	8.7	8.2	10.3	9.2	11.7	9.2	9.2	9.5	8.5	9.8	8.0	8.2	8.3	5.8		92.3	92.1	92.1	H2	
EU627194	4.1	6.3	6.3	6.8	6.0	4.8	6.7	7.7	4.1	3.2	2.9	3.4	2.0	0.9	5.1	3.4	5.8	3.6	3.4	6.3	4.8	5.5	6.3	7.2	6.8	7.7	8.2		99.8	99.8	EU627194	
EU627193	4.3	6.5	6.5	7.0	6.3	5.0	7.0	7.9	4.3	3.4	3.2	3.6	2.2	1.1	5.3	3.6	6.0	3.9	3.6	6.5	5.0	5.8	6.5	7.5	7.0	8.0	8.5	0.2		99.6	EU627193	
FJ911609	4.3	6.5	6.5	7.0	6.3	5.0	7.0	8.0	4.3	3.4	3.2	3.6	2.2	1.1	5.3	3.6	5.5	3.4	3.6	6.5	5.0	5.8	6.5	7.5	7.0	8.0	8.5	0.2	0.4		FJ911609	

B3N: B3NIE97, B3U: B3USA94, C2U: C2USA77, C2D: C2DEU90, D5B: D5BLA93, D5T: D5THA93; D7A: D7AUS85, D7U: D7USA99.

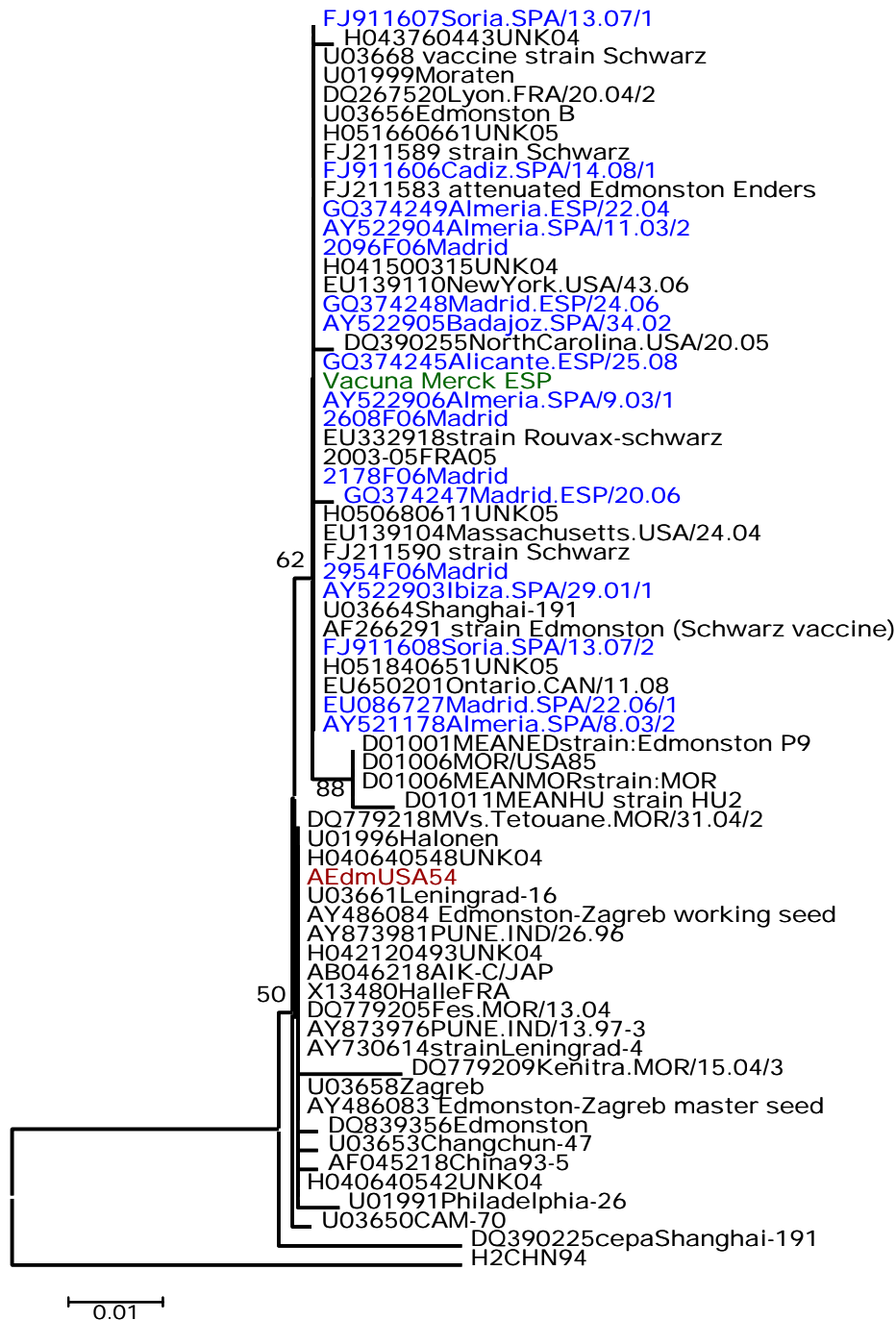
Figura 38. Distancias por pares de Clustal W (Equilibrado) entre los genotipos de referencia de MeV y la secuencia española de genotipo D9.

		PORCENTAJE DE SIMILITUD																												
PORCENTAJE DE DIVERGENCIA	3782F08Gra	A	B1	B2	B3N	B3U	C1	C2U	C2D	D1	D2	D3	D4	D5B	D5T	D6	D7A	D7U	D8	D9	D10	E	F	G1	G2	G3	H1	H2	3782F08Gra	
	A	6.5	93.9	93.0	92.1	92.5	93.2	93.0	91.4	90.6	94.5	95.0	95.6	95.2	95.6	96.3	93.6	95.2	93.6	95.4	96.9	92.1	92.5	92.8	91.7	91.0	91.4	90.8	89.9	A
	B1	7.5	3.9	96.3	96.7	95.8	96.5	97.1	95.0	93.9	96.1	97.4	95.4	95.0	95.4	96.5	94.7	95.0	92.8	95.2	94.5	94.1	96.7	96.1	94.5	94.5	95.0	93.9	92.8	B1
	B2	8.5	3.4	4.6	95.6	95.8	95.2	93.4	91.9	94.1	95.4	93.4	93.0	93.6	94.5	93.6	93.0	91.2	92.8	92.5	92.5	95.2	94.1	92.5	93.0	93.0	92.3	90.8	B2	
	B3N	8.0	4.3	3.2	4.6	98.0	95.4	93.4	92.8	94.1	94.5	93.4	92.5	93.2	94.1	92.8	93.4	91.2	93.0	92.5	92.3	94.7	94.3	92.5	92.5	93.0	91.9	91.0	B3N	
	B3U	7.2	3.6	2.0	4.3	2.0	95.8	94.1	93.4	94.7	95.2	94.1	93.2	93.9	94.7	93.0	94.1	91.9	93.4	93.2	92.3	95.4	94.7	93.2	93.2	93.6	92.1	91.2	B3U	
	C1	7.5	2.9	4.6	5.0	4.8	4.3	96.1	95.0	95.4	95.8	94.3	94.7	94.7	95.8	94.1	94.3	92.1	94.1	93.9	94.3	96.9	95.8	93.9	94.5	95.0	93.2	92.3	C1	
	C2U	9.2	5.3	6.5	7.0	7.0	6.2	4.1	98.0	93.2	94.1	93.0	92.5	93.0	94.1	91.9	93.4	91.2	92.3	92.1	91.2	94.3	93.6	91.9	92.3	92.8	90.8	89.9	C2U	
	C2D	10.2	6.5	7.7	8.7	7.7	7.0	5.3	2.0	98.0	93.2	92.5	91.7	92.1	93.2	91.0	92.1	90.8	91.4	91.2	90.4	93.2	92.5	90.8	91.2	91.7	89.7	88.8	C2D	
	D1	5.7	4.1	5.3	6.2	6.2	5.5	4.8	7.2	8.2	96.9	95.8	95.4	96.1	96.5	95.6	95.8	93.9	95.2	95.0	94.5	95.0	94.7	93.9	93.4	93.9	93.0	92.1	D1	
	D2	5.3	2.7	5.3	4.8	5.8	5.1	4.3	6.2	7.2	3.2	96.7	96.3	96.7	97.4	95.6	96.3	94.1	96.3	95.8	95.8	95.4	94.7	93.6	93.6	94.1	93.6	93.2	D2	
	D3	4.6	4.8	6.5	7.0	7.0	6.3	6.0	7.5	8.0	4.3	3.4	96.1	96.9	97.6	94.5	96.5	94.3	95.8	96.1	93.4	93.9	93.6	92.5	92.1	92.5	92.3	91.2	D3	
	D4	5.0	5.3	7.5	7.5	8.0	7.3	5.5	8.0	9.0	4.8	3.9	4.1	96.5	97.1	94.1	96.1	93.9	95.8	96.1	93.9	93.9	93.6	92.1	92.1	92.5	92.3	91.7	D4	
	D5B	4.5	4.8	6.7	6.7	7.2	6.5	5.5	7.4	8.4	4.1	3.4	3.2	3.6	98.5	95.0	96.5	94.7	96.3	96.9	93.9	94.5	93.6	93.0	92.5	93.0	92.5	91.9	D5B	
	D5T	3.8	3.6	5.8	5.8	6.3	5.5	4.3	6.2	7.2	3.6	2.7	2.5	2.9	1.6	95.8	97.1	95.0	96.9	97.1	94.5	95.4	94.7	94.1	93.6	94.1	93.2	92.3	D5T	
	D6	6.7	5.5	7.2	6.7	7.8	7.5	6.2	8.7	9.7	4.5	4.6	5.8	6.3	5.3	4.3	94.1	92.3	94.3	94.1	93.2	94.3	93.2	91.9	92.8	92.8	91.4	90.6	D6	
	D7A	5.0	5.3	7.0	7.5	7.0	6.3	6.0	7.0	8.4	4.3	3.9	3.6	4.1	3.6	2.9	6.2	96.1	96.3	95.6	93.4	93.9	93.6	92.5	92.1	93.0	93.2	91.4	D7A	
	D7U	6.7	7.8	9.1	9.6	9.6	8.8	8.5	9.5	10.0	6.5	6.3	6.0	6.5	5.5	5.3	8.3	4.1	94.5	93.4	91.2	91.9	91.4	91.0	90.4	91.2	90.4	89.5	D7U	
	D8	4.8	5.0	7.2	7.7	7.5	7.0	6.2	8.2	9.2	5.0	3.9	4.3	4.3	3.8	3.2	6.0	3.8	5.8	95.8	93.6	93.6	93.0	91.9	92.3	93.2	93.2	91.4	D8	
	D9	3.2	5.8	7.5	8.0	8.0	7.3	6.5	8.5	9.5	5.3	4.3	4.1	4.1	3.2	2.9	6.2	4.6	7.0	4.3	93.0	93.4	93.6	92.5	92.1	92.5	92.1	91.4	D9	
	D10	8.5	6.2	8.5	8.0	8.3	8.3	6.0	9.5	10.5	5.7	4.3	7.0	6.5	6.5	5.8	7.2	7.0	9.6	6.7	7.5	93.4	92.8	91.2	91.7	92.1	91.4	91.2	D10	
	E	8.0	3.4	5.0	5.0	5.5	4.8	3.1	6.0	7.2	5.2	4.8	6.5	6.5	5.7	4.8	6.0	6.5	8.8	6.7	7.0	7.0	95.0	93.9	93.4	93.9	92.8	92.1	E	
	F	7.7	4.1	5.8	6.2	6.0	5.5	4.3	6.7	7.9	5.5	5.5	6.8	6.7	6.7	5.5	7.2	6.7	9.3	7.5	6.7	7.7	5.3	93.2	92.8	93.2	91.9	91.0	F	
	G1	9.0	5.8	7.0	8.0	8.0	7.3	6.5	8.7	10.0	6.5	6.8	8.0	8.5	7.5	6.2	8.8	8.0	9.8	8.8	8.0	9.5	6.5	7.2	94.5	95.0	93.0	92.5	G1	
G2	9.8	5.8	7.0	7.5	8.0	7.3	5.7	8.2	9.5	7.0	6.7	8.5	8.5	8.0	6.7	7.7	8.5	10.6	8.2	8.5	9.0	7.0	7.7	5.8	97.4	93.6	92.3	G2		
G3	9.3	5.3	6.1	7.5	7.5	6.8	5.3	7.7	9.0	6.5	6.3	8.0	8.0	7.5	6.3	7.7	7.5	9.6	7.2	8.0	8.5	6.5	7.3	5.3	2.7	93.6	92.3	G3		
H1	10.0	6.5	8.3	8.2	8.8	8.5	7.2	10.0	11.3	7.4	6.7	8.2	8.2	7.9	7.2	9.2	7.2	10.6	7.2	8.5	9.2	7.7	8.7	7.5	6.7	6.7	94.5	H1		
H2	11.1	7.7	9.3	10.0	9.8	9.6	8.2	11.1	12.4	8.5	7.2	9.5	9.0	8.7	8.2	10.3	9.2	11.7	9.2	9.2	9.5	8.5	9.8	8.0	8.2	8.3	5.8	H2		

B3N: B3NIE97, B3U: B3USA94, C2U: C2USA77, C2D: C2DEU90, D5B: D5BLA93, D5T: D5THA93; D7A: D7AUS85, D7U: D7USA99.

8. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE GENOTIPO A

Figura 39. Filograma de secuencias pertenecientes al genotipo A. Las secuencias españolas están coloreadas en azul e incluyen el número de acceso a GenBank, el número de la cepa, año y procedencia; la vacuna utilizada en España se muestra en color verde, las obtenidas de bases de datos en negro y la de referencia de genotipo A en rojo. Las de GenBank utilizadas incluyen el número de acceso seguido del lugar de origen, la semana epidemiológica de aparición de síntomas, el año y, en su caso, el número de secuencia de esa semana. En la figura solo se muestran los "bootstrap" mayores de 49.



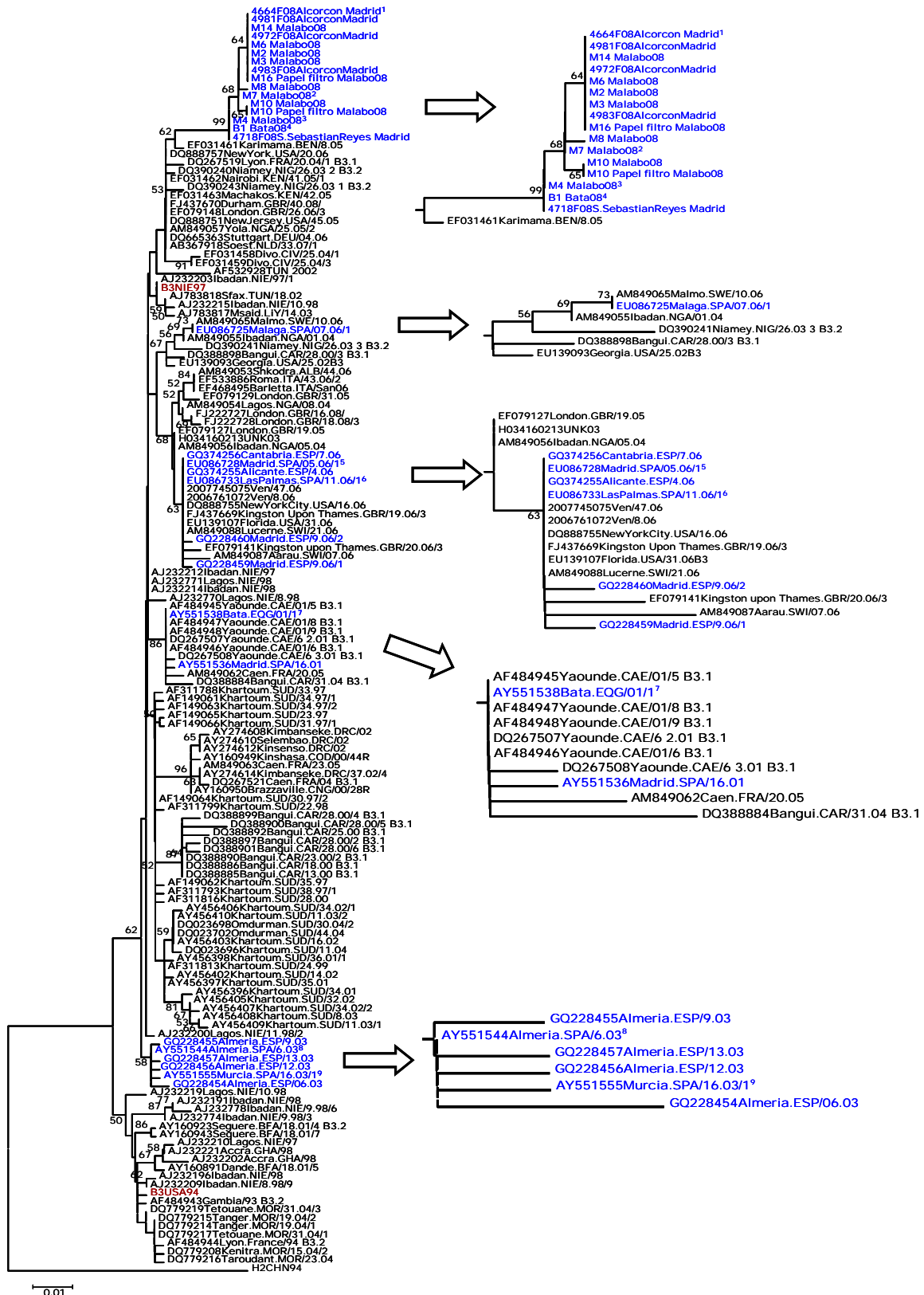
Todas las secuencias españolas de genotipo A, excepto dos con datos sobre vacunación desconocida (AY522905Badajoz.SPA/34.02 y 2096F06Madrid), tenían antecedente de haber recibido una dosis de vacunación dentro de los 17 días anteriores a la aparición del exantema. Todas ellas, excepto la GQ374247Madrid.ESP/20.06 que difiere en un solo nucleótido, son idénticas, en el fragmento analizado, a la cepa atenuada Edmonston-Enders incluida en la vacuna triple vírica usada en España, MSD Triple Anti-Sarampión, Rubéola, Parotiditis (Sanofi Pasteur MSD, León, Francia) (Tabla 13).

Tabla 13. Comparación de las sustituciones nucleotídicas entre la vacuna utilizada en nuestro país, las secuencias de genotipo A detectadas en España y las secuencias próximas detectadas en otros países. El número de nucleótido está referido al fragmento del extremo 3' del gen N, de 456 nucleótidos.

	Posición nucleotídica				
	81	128	287	350	447
<i>Vacuna Merck ESP</i>	T	T	G	C	T
<i>FJ911607Soria.SPA/13.07/1</i>
<i>FJ911608Soria.SPA/13.07/2</i>
<i>GQ374249Almeria.ESP/22.04</i>
<i>FJ911606Cadiz.SPA/14.08/1</i>
<i>GQ374247Madrid.ESP/20.06</i>	.	.	A	.	.
<i>2003-05FRA05</i>
<i>2096F06Madrid</i>
<i>GQ374248Madrid.ESP/24.06</i>
<i>2178F06Madrid</i>
<i>2608F06Madrid</i>
<i>2954F06Madrid</i>
<i>GQ374245Alicante.ESP/25.08</i>
<i>AF266291 strain Edmonston (Schwarz vacc)</i>
<i>AY521178Almeria.SPA/8.03/2</i>
<i>AY522903Ibiza.SPA/29.01/1</i>
<i>AY522904Almeria.SPA/11.03/2</i>
<i>AY522905Badajoz.SPA/34.02</i>
<i>AY522906Almeria.SPA/9.03/1</i>
<i>DQ267520Lyon.FRA/20.04/2</i>
<i>EU086727Madrid.SPA/22.06/1</i>
<i>EU139110NewYork.USA/43.06</i>
<i>EU332918strain Rouvax-schwarz</i>
<i>FJ211583 attenuated Edmonston Enders</i>
<i>FJ211589 strain Schwarz</i>
<i>FJ211590 strain Schwarz</i>
<i>H041500315UNK04</i>
<i>H050680611UNK05</i>
<i>H051660661UNK05</i>
<i>H051840651UNK05</i>
<i>U01999Moraten</i>
<i>U03656Edmonston B</i>
<i>U03664Shanghai-191</i>
<i>U03668 vaccine strain Schwarz</i>
<i>DQ390255NorthCarolina.USA/20.05</i>	.	A	.	.	.
<i>H043760443UNK04</i>	.	.	.	T	.
<i>EU139104Massachusetts.USA/24.04</i>	Y
<i>EU650201Ontario.CAN/11.08</i>	Y

9. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE GENOTIPO B3

Figura 40. Filograma de secuencias pertenecientes al genotipo B3. Las secuencias de referencia están coloreadas en rojo, las españolas en azul y las obtenidas de las bases de datos en negro. Las de GenBank utilizadas incluyen el número de acceso seguido del lugar de origen, la semana epidemiológica de aparición de síntomas, el año y, en su caso, el número de secuencia de esa semana. En la figura solo se muestran los "bootstrap" mayores de 49.



¹ Representa a 20 secuencias.² Representa a 2 secuencias.³ Representa a 2 secuencias.⁴ Representa a 4 secuencias.⁵ Representa a 80 secuencias.⁶ Representa a 10 secuencias.⁷ Representa a 3 secuencias.⁸ Representa a 75 secuencias.⁹ Representa a 3 secuencias.

En el año 2001 se obtuvieron tres secuencias (AY551538 Bata.EQG/01/1) de un brote de sarampión ocurrido en Guinea Ecuatorial a partir de muestras de sangre seca en papel de filtro (sección 1.4 de Material y Métodos y sección 4.1 de Resultados) [147]. Cabe destacar que otras secuencias del año 2001 procedentes de Camerún y la República Centroafricana son similares a la cepa de Guinea del 2001 mostrando cómo el brote excedió a Guinea Ecuatorial [149, 155]. Igualmente, una secuencia procedente de un caso esporádico de la Comunidad de Madrid importado de Guinea el mismo año 2001 por un viajero (AY551536 Madrid.SPA/16.01), se agrupó con las obtenidas de las muestras de sangre confirmando los datos epidemiológicos, a pesar de presentar un nucleótido de diferencia en el fragmento analizado con las del brote activo en Guinea en aquel momento (Tabla 14).

		Posición nucleotídica						
		129	196	234	284	378	381	426
Secuencias y cambios nucleotídicos	AY551536Madrid.SPA/16.01	G	G	G	C	C	G	A
	AY551538Bata.EQG/01/1 [B3]			A				
	AF484945Yaounde.CAE/01/5_B3.1			A				
	AF484946Yaounde.CAE/01/6_B3.1			A				
	AF484947Yaounde.CAE/01/8_B3.1			A				
	AF484948Yaounde.CAE/01/9_B3.1			A				
	DQ267507Yaounde.CAE/6_2.01_B3.1			A				
	DQ267508Yaounde.CAE/6_3.01_B3.1		A	A				
	AM849062Caen.FRA/20.05			A		A		G
	DQ388884Bangui.CAR/31.04_B3.1	A		A	T		A	

Tabla 14. Comparación de las sustituciones nucleotídicas entre secuencias del caso de Madrid de 2001 procedente de Guinea Ecuatorial, del brote de Guinea Ecuatorial del mismo año y de las secuencias próximas detectadas en otros países. El número de nucleótido está referido al fragmento del extremo 3' del gen N, de 456 nucleótidos.

El brote más importante en cuanto a número de casos de genotipo B3, 190, se produjo en la provincia de Almería en el año 2003 (AY551544 Almería.SPA/6.03), afectando a otros tres casos en Murcia vinculados con el brote (AY551555 Murcia.SPA/16.03/1). El caso índice fue un marinero argelino, y las secuencias encontradas durante el brote no se asemejan a ninguna otra conocida de B3. La misma situación se produjo en Lyon (Francia) en 2004, donde un viajero importó una

cepa de B3.1 (DQ267519 Mvi/Lyon.FRA/20.04/1) procedente de Argelia [156]. Esto llevó a suponer que en el norte de África también circulaban cepas B3 de las cuales no teníamos conocimiento y que eran diferentes tanto a las del Centro y Oeste del continente africano [149, 151, 157, 158] como a las publicadas procedentes de Marruecos [156, 159].

A lo largo del tiempo, durante el brote se produjeron los cambios en la secuencia original del caso índice que se aprecian en la Tabla 15.

<i>Nº Secuencias</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Nº Acceso GenBank</i>	<i>Sem/año</i>	<i>Cambios nucleotídicos (aminoácidos)* en 456 nt del gen N</i>
				<i>MVs/Almería. SPA/5.03**</i>
75	MVs/Almería. SPA/5.03**	AY551544	4-26/2003	
1	MVs/Almería. SPA/6.03	GQ228454	6/2003	T-a-C 1380 (L473P) T-a-C 1418 (sin)
1	MVs/Almería. SPA/9.03	GQ228455	9/2003	T-a-C 1200 (sin.)
1	MVs/Almería. SPA/12.03	GQ228456	12/2003	C-a-A 1535 (T512K)
1	MVs/Almería. SPA/13.03	GQ228457	13/2003	C-a-A 1495 (Q499K)
3	MVs/Murcia. SPA/14.03/1	AY551555	13y16/2003	G-a-A 1386 (sin.)

*Los cambios están referidos al gen completo de la nucleoproteína siguiendo la secuencia U01987 Edmonston tipo salvaje.

**Representa a 73 secuencias de la provincia de Almería, una de Granada y otra de Murcia. Sin.: secuencia sinónima a la MVs/Almería.SPA/5.03.

Tabla 15. Cambios nucleotídicos y aminoacídicos producidos durante el brote de Almería 2003.

El brote de 174 casos ocurrido en Madrid en el año 2006 (EU086728 Madrid.SPA/05.06/1) tenía como caso índice uno procedente del condado de Doncaster en Gran Bretaña y presenta tan solo un nucleótido de diferencia con la principal cepa de genotipo B3 que circulaba en la zona en ese período de tiempo (EF079127 London.GBR/19.05) [160]. No se ha observado ninguna diferencia con una segunda cepa inglesa del mismo periodo de tiempo (FJ437669 Kingston Upon Thames.GBR/19.06/3). La misma cepa encontrada en Madrid produjo casos en Valencia y Santander (Cantabria). A lo largo del tiempo, durante el brote se produjeron los cambios en la secuencia original del caso índice que se aprecian en la Tabla 16. El caso que se produjo en Santander se trataba de un piloto de origen

venezolano que estuvo de vacaciones en París y Madrid y que posteriormente contagió a 23 personas en Venezuela [161], siendo, de hecho, las secuencias de este brote venezolano idénticas a las de Madrid. Igualmente, es idéntica a un caso de B3 exportado a Estados Unidos desde Gran Bretaña y a un caso detectado en Nueva York que supuestamente se expuso a la enfermedad en Disneylandia (comunicación personal del Dr. Paul Rota).

<i>Nº Secuencias</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Nº Acceso GenBank</i>	<i>Sem/año</i>	<i>Cambios nucleotídicos (aminoácidos) * en 456 nt del gen N</i>	
				<i>MVs/Madrid.SPA/5.06/1</i>	
80	MVs/Madrid.SPA/5.06/1	EU086728	4-35/2006		
1	MVs/Madrid.ESP/9.06/1	GQ228459	9/2006	G-a-A 1153	(G385S)
1	MVs/Madrid.ESP/9.06/2	GQ228460	9/2006	G-a-A 1342	(G448R)

*Los cambios están referidos al gen completo de la nucleoproteína siguiendo la secuencia U01987 Edmonston tipo salvaje.

Tabla 16. Cambios nucleotídicos y aminoacídicos producidos durante el brote de Madrid 2006.

El brote de B3 ocurrido en Las Palmas de Gran Canaria con 13 casos implicados en el año 2006 (EU086733 Las Palmas.SPA/11.06/1) tenía igualmente una secuencia similar a la cepa (FJ437669 Kingston Upon Thames.GBR/19.06/3) que circulaba en el Reino Unido. En este brote el caso índice había coincidido en el aeropuerto de Zurich con una persona infectada procedente de Gran Bretaña. Dicho caso índice dio lugar a 13 casos más en la isla de Gran Canaria [162].

Como se puede ver en la Tabla 17, las cepas de Kingston upon Thames en Londres (FJ437669 Kingston Upon Thames.GBR/19.06/3), Madrid (EU086728 Madrid.SPA/05.06/1), Valencia (GQ374255 Alicante.ESP/4.06), Santander (GQ374256 Cantabria.ESP/7.06), Nueva York (DQ888755 New York City.USA/16.06), Florida (EU139107 Florida.USA/31.06) y Las Palmas (EU086733 Las Palmas.SPA/ 11.06/1) son iguales. Además, la secuencia EU086728 Madrid.SPA/05.06/1 es idéntica en sus 456 nucleótidos del extremo 3' del gen N a las dos secuencias venezolanas, 2006761072 Venezuela/8.06 y 2007745075 Venezuela/47.06, que representan el brote producido por el piloto que había viajado a Madrid durante sus vacaciones.

		Posiciones nucleotídicas																
		36	42	84	100	180	242	263	280	281	358	359	360	365	367	414	423	428
Secuencias y cambios nucleotídicos	EU086728Madrid.SPA/05.06/1	C	C	T	A	T	G	C	C	C	G	C	C	T	A	A	T	T
	EU086733LasPalmas.SPA/11.06/1
	GQ374255Alicante.ESP/4.06
	GQ374256Cantabria.ESP/7.06
	2006761072Venezuela/8.06
	2007745075Venezuela/47.06
	FJ437669Kingston Upon Thames.GBR/19.06/3
	EU139107Florida.USA/31.06
	DQ888755NewYorkCity.USA/16.06
	EF079127London.GBR/19.05	G	.
	H034160213UNK03	G	.
	AM849056Ibadan.NGA/05.04	G	.
	AM849054Lagos.NGA/08.04	A	G	.	.
	FJ222727London.GBR/16.08	A	A	G	.	.
	EF079141Kingston upon Thames.GBR/20.06/3	C	C
	FJ222728London.GBR/18.08/3	.	.	.	C	.	A	G	.	.
	AM849088Lucerne.SWI/21.06	Y	Y
	AM849053Shkodra.ALB/44.06	.	T	.	.	.	A	T	G	.	.
	AM849087Aarau.SWI/07.06	T	G	N	N	T
	EF079129London.GBR/31.05	A	.	C	.	.	A	T	G	.	.
EF468495Barletta.ITA/San06	.	T	.	.	C	A	T	G	.	.	
EF533886Roma.ITA/43.06/2	.	T	.	.	C	A	T	G	.	.	

Tabla 17. Comparación de las sustituciones nucleotídicas entre secuencias de los brotes de Madrid, Las Palmas y casos esporádicos de Valencia y Santander; y secuencias próximas detectadas en otros países. El número de nucleótido está referido al fragmento del extremo 3´ del gen N, de 456 nucleótidos.

Asimismo, un caso esporádico ocurrido en Málaga en 2006 (EU086725 Malaga.SPA/07.06/1) resultó tener la misma secuencia de 456 nt que un caso detectado en Malmoe (Suecia) (AM849065 Malmo.SWE/10.06) ocurrido con una diferencia de 3 semanas [43] (Tabla 18). Este caso correspondía a un brote que afectó a ambas orillas del estrecho de Oresund entre Malmoe y Copenhague, ciudades que están unidas por un puente y varios ferries al día. Las secuencias detectadas en Malmoe y Copenhague eran iguales. Estas secuencias quedan incluidas en el filograma en un grupo en el que están otras de países del África subsahariana, sugiriendo un posible origen importado de esta área, aunque los valores de "bootstrap" no permiten sustentar esta posible relación.

		Posición nucleotídica								
		33	159	168	246	266	279	286	289	300
Secuencias y cambios nucleotídicos	EU086725Malaga.SPA/07.06/1_B3	T	C	G	C	G	C	G	G	C
	AM849065Malmo.SWE/10.06
	AM849055Ibadan.NGA/01.04	A	.
	DQ388898Bangui.CAR/28.00/3_B3.1	C	T	.	T	.	T	.	A	.
	DQ390241Niamey.NIG/26.03_3_B3.2	.	.	A	.	.	T	A	A	T
	EU139093Georgia.USA/25.02B3	.	T	.	.	T	T	.	A	.

Tabla 18. Comparación de las sustituciones nucleotídicas entre una secuencia esporádica de Málaga, un caso del brote ocurrido en Malmoe (Suecia) y secuencias próximas detectadas en otros países. El número de nucleótido está referido al fragmento del extremo 3´ del gen N, de 456 nucleótidos.

En el año 2008 los genotipos B3 detectados en un brote de 19 casos en la localidad de Alcorcón (4664F08 Alcorcón Madrid) y en un niño de Guinea Ecuatorial residente en San Sebastián de los Reyes (Madrid) no relacionado con el brote (4718F08 San Sebastián de los Reyes Madrid), presentan una gran similitud con las secuencias obtenidas de muestras de exudado faríngeo de niños recogidas en Bata y Malabo (Guinea Ecuatorial) (B1 Bata 08 y M2 Malabo 08) en el mismo período de tiempo (máxima diferencia: dos nucleótidos, Tabla 19) sugiriendo que el caso índice del brote podría ser de origen guineano o de algún país de su entorno.

En el brote ocurrido en Alcorcón no se observa variación en las secuencias, mientras que en el brote de Guinea Ecuatorial se observa una mayor variación, con cinco tipos diferentes de secuencias (Tabla 19 y Tabla 20). Esto reflejaría mayor tiempo de evolución del genotipo B3 en Guinea Ecuatorial, cuyo brote fue ya detectado en el mes de abril, mientras que el de Alcorcón (Madrid) solo se mantuvo activo 3 semanas. Tanto las secuencias del brote (representadas por 4664F08 Alcorcón Madrid) como la del caso esporádico de Madrid (4718F08 San Sebastián de los Reyes Madrid) son idénticas a uno de los tipos de secuencia encontrado en el brote de Guinea Ecuatorial, sugiriendo dos episodios diferentes de importación desde un mismo origen geográfico.

		Posición nucleotídica										
		30	136	171	221	231	258	354	370	392	405	414
Secuencias y cambios nucleotídicos	<i>4664F08Alcorcon_Madrid</i>	A	T	G	A	T	T	T	T	C	C	A
	<i>4972F08Alcorcon_Madrid</i>
	<i>4981F08Alcorcon_Madrid</i>
	<i>4983F08Alcorcon_Madrid</i>
	<i>M14 Malabo08</i>
	<i>M16 Papel filtro Malabo08</i>
	<i>M2 Malabo08</i>
	<i>M3 Malabo08</i>
	<i>M6 Malabo08</i>
	<i>M7 Malabo08</i>	C	.	.	.
	<i>4718F08SSebastián Reyes_Madrid</i>	.	.	A	C	.	.	.
	<i>M4 Malabo08</i>	.	.	A	C	.	.	.
	<i>B1 Bata 08</i>	.	.	A	C	.	.	.
	<i>M10 Malabo08</i>	C	T	.	.
	<i>M10 Papel filtro Malabo08</i>	C	T	.	.
	<i>M8 Malabo08</i>	C	.	C	.	.	.
	<i>EF031461Karimama.BEN/8.05</i>	C	C	A	G	C	.	C	C	.	A	G

Tabla 19. Sustituciones nucleotídicas entre secuencias del brote de Alcorcón y de Guinea Ecuatorial, 2008. El número de nucleótido está referido al fragmento del extremo 3' del gen N, de 456 nucleótidos.

<i>Nº Sec</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Sem/año</i>	<i>Cambios nucleotídicos (aminoácidos) * en 456 nt del gen N</i>
			<i>4664F08 Alorcón Madrid</i>
9	4664F08 Alorcón Madrid	40 y 47-48/2008	
3	4718F08 S.Sebastián Reyes Madrid	36 y 48/2008	G-a-A 1293, T-a-C 1492
1	M7 Malabo08	47/2008	T-a-C 1492
1	M8 Malabo08	48/2008	T-a-C 1380, T-a-C 1492
1	M10 Malabo08	48/2008	T-a-C 1492, C-a-T 1514 (S505L)

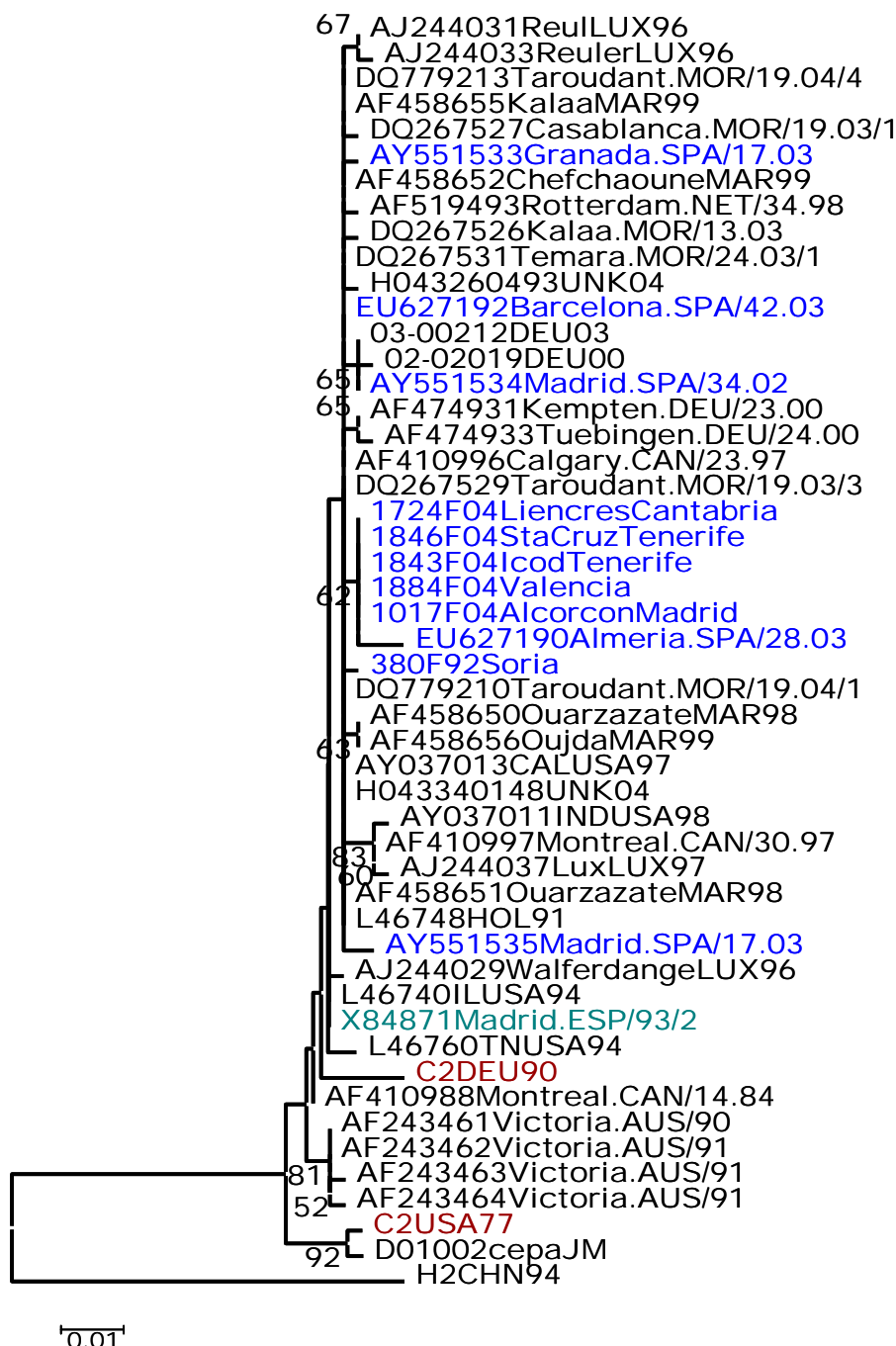
*Los cambios están referidos al gen completo de la nucleoproteína siguiendo la secuencia U01987 Edmonston tipo salvaje

Tabla 20. Cambios nucleotídicos y aminoácidos producidos durante el brote de Alorcón y el de Guinea Ecuatorial 2008.

Por último destacar que todas las secuencias B3 encontradas en España pertenecerían al subgrupo B3.1 definido por la Dra. Waku Kouomou en su artículo del año 2002, puesto que se agrupan con la secuencia B3NIE97 de referencia que representa a dicho subgrupo. El subgrupo B3.1 se supone predominante en el África subsahariana [43, 149].

10. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE GENOTIPO C2

Figura 41. Filograma de secuencias pertenecientes al genotipo C2. Las secuencias de referencia están coloreadas en rojo, las secuencias españolas obtenidas en este estudio en azul, una secuencia española del año 93 se muestra en verde y las obtenidas de la base de datos GenBank en negro. Las de GenBank utilizadas incluyen el número de acceso seguido del lugar de origen, la semana epidemiológica de aparición de síntomas, el año y, en su caso, el número de secuencia de esa semana. En la figura solo se muestran los valores de "bootstrap" mayores de 49.



Según la información bibliográfica disponible, el genotipo C2 era el prevalente en España entre los años 1992 y 1993, hasta que fue reemplazado por D3, renombrado

D6 en 1998 [21], el cual circuló en España desde otoño de 1994 a 1997 (X84871 Madrid.ESP/93/2) [163, 164]. Las muestras de colección disponibles en el ISCIII de las que hemos podido obtener productos de amplificación para genotipificar corresponden a un brote de Soria del año 1992 (380F92 Soria) que pertenecía al genotipo C2, el cual, no obstante, no se asemeja a la secuencia del 93 (X84871 Madrid.ESP/93/2). Probablemente, el hecho de que en ese momento el MeV fuera endémico permitía que circularan diversas variantes del mismo genotipo.

Posteriormente, se han observado casos esporádicos entre los años 2002 al 2004. Alguno de ellos se ha podido relacionar con viajes a Marruecos (o contacto con personas procedentes de ese país); aunque en la mayoría de casos no se ha podido establecer el origen de la cepa. Por otro lado, el genotipo detectado en Marruecos desde 1998 hasta 2003 era C2 y se consideraba endémico [156, 165]. Sin embargo, los genotipos publicados en Marruecos desde el año 2004 no corresponden al genotipo C2, sino a B3 (DQ779217Tetouane.MOR/31.04/1 por ejemplo, Figura 40) [159], aunque en la base de datos GenBank sí que hay secuencias marroquíes de genotipo C2 del año 2004 iguales a las de 2003 (Tabla 21).

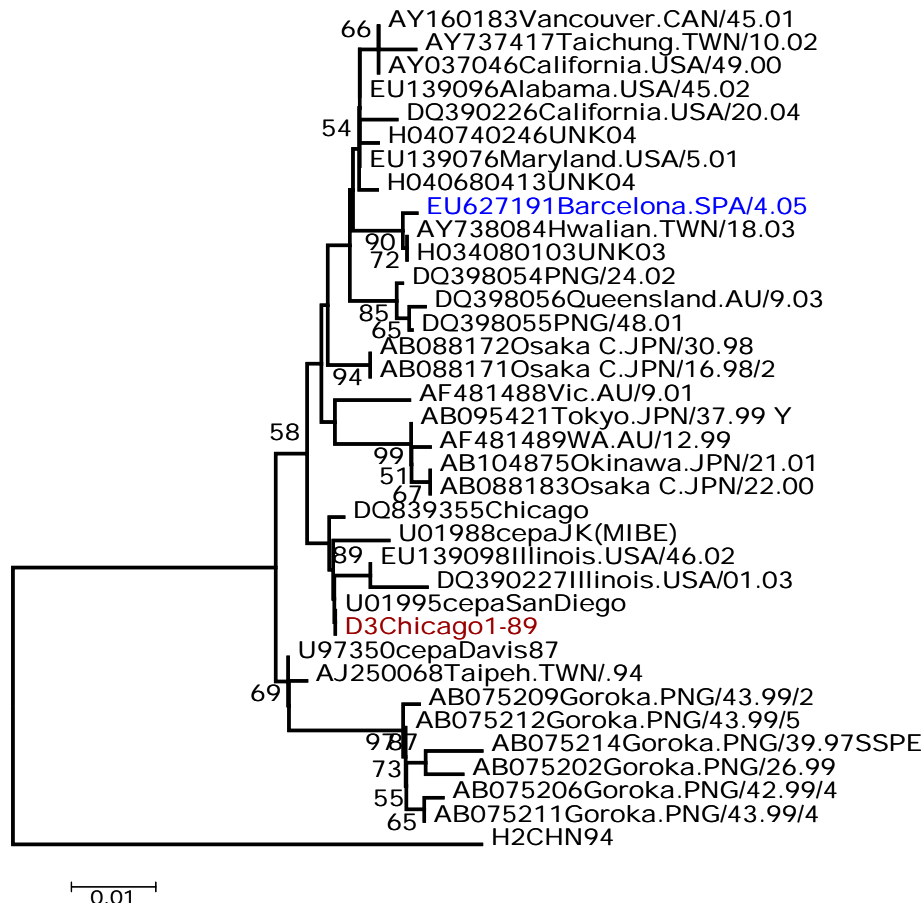
En la Tabla 21 se puede apreciar que la mayoría de las secuencias españolas del año 2004, una del 2003 y otra del 2002, presentan una identidad del 100% en la región variable del gen N, a pesar de ser casos esporádicos de distintas provincias. Esto podría explicarse si se tratara de importaciones desde el mismo lugar de origen, sin embargo no disponemos de esta información en todas las secuencias C2 encontradas en España. Teniendo en cuenta que se sabe por los datos epidemiológicos que la secuencia del año 2003 procede de Marruecos, podría inferirse un mismo origen geográfico para las otras dos. Por otra parte, estas secuencias no presentan diferencias nucleotídicas con otras detectadas en Marruecos en los años 2003 y 2004; como por ejemplo DQ267529 Taroudant.MOR/19.03/3, DQ779210 Taroudant.MOR/19.04/1, DQ779213 Taroudant.MOR/19.04/4, DQ267526 Kalaa.MOR/13.03, DQ267531 Temara.MOR/24.03/1. Sin embargo, son también idénticas a las cepas MVs/Calgary.CAN/23.97 y MVs/California.USA/22.97, que tienen antecedentes epidemiológicos relacionados con virus que circularon en Alemania; a la secuencia holandesa de 1991 L46748HOL91 y a la secuencia de Londres MVs/London.GBR/29.04 que circuló en el año 2004.

		Posiciones nucleotídicas																																															
		9	27	72	99	100	114	123	136	158	179	195	200	222	256	264	267	276	294	313	348	351	405	406	414	425	447	453																					
Secuencias y cambios nucleotídicos	AY551534Madrid.SPA/34.02	C	A	A	T	A	C	C	C	G	G	G	A	A	A	G	A	T	T	T	G	A	C	T	G	G	C	C																					
	GQ374253Cantabria.ESP/25.04																				
	GQ374254Sta CruzTenerife.ESP/16.04																				
	GQ374251Sta CruzTenerife.ESP/18.04																				
	GQ374250Alicante.ESP/26.04																				
	EU627192Barcelona.SPA/42.03																				
	AF410996Calgary.CAN/23.97 EX GER																				
	AY037013CALUSA97 EX GER																				
	DQ267526Kalaam.MOR/13.03																				
	DQ267529Taroudant.MOR/19.03/3																				
	DQ267531Temara.MOR/24.03/1																				
	DQ779210Taroudant.MOR/19.04/1																				
	DQ779213Taroudant.MOR/19.04/4																				
	H043340148 MVs/London.GBR/29.04																				
	L46748HOL91																				
	AY551533Granada.ESP/17.03	T																				
	380F92Soria	.	G																				
	H043260493 MVs/London.GBR/31.04	A	.	.																				
	03-00212DEU03	C																				
	AF458651OuarzazateMAR98	T	.																				
	AF458652ChefchaouneMAR99	T	.																				
	AF474931Kempton.DEU/23.00	G																				
	AF519493Rotterdam.NET/34.98	G																				
	AJ244031ReulLUX96	G																				
	DQ267527Casablanca.MOR/19.03/1	C																				
	GQ374252Madrid.ESP/16.04	T	A																				
	AY551535Madrid.SPA/17.03	.	.	.	C	G																				
	AF458655KalaamMAR99	T	T	.	.																				
	AF458656OujdaMAR99	A	T	.	.																				
	AF458650OuarzazateMAR98	A	T	.	.																				
	02-02019DEU00	C	C																				
	AF410997Montreal.CAN/30.97	T	G																				
	AF474933Tuebingen.DEU/24.00	G	C	.	.																				
AJ244033ReulerLUX96	T	G																					
EU627190Almeria.SPA/28.03	T	C	.	.	A																					
AY037011INDUSA98	T	.	.	.	A	C	.	.	A	.	G																					
X84871Madrid.ESP/93/2	T	C	T	.																					
AJ244037LuxLUX97	.	.	.	C	T	G	A																					

Tabla 21. Sustituciones nucleotídicas entre secuencias C2 detectadas en España y otras secuencias próximas detectadas en otros países. El número de nucleótido está referido al fragmento del extremo 3' del gen N, de 456 nucleótidos.

11. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE GENOTIPO D3

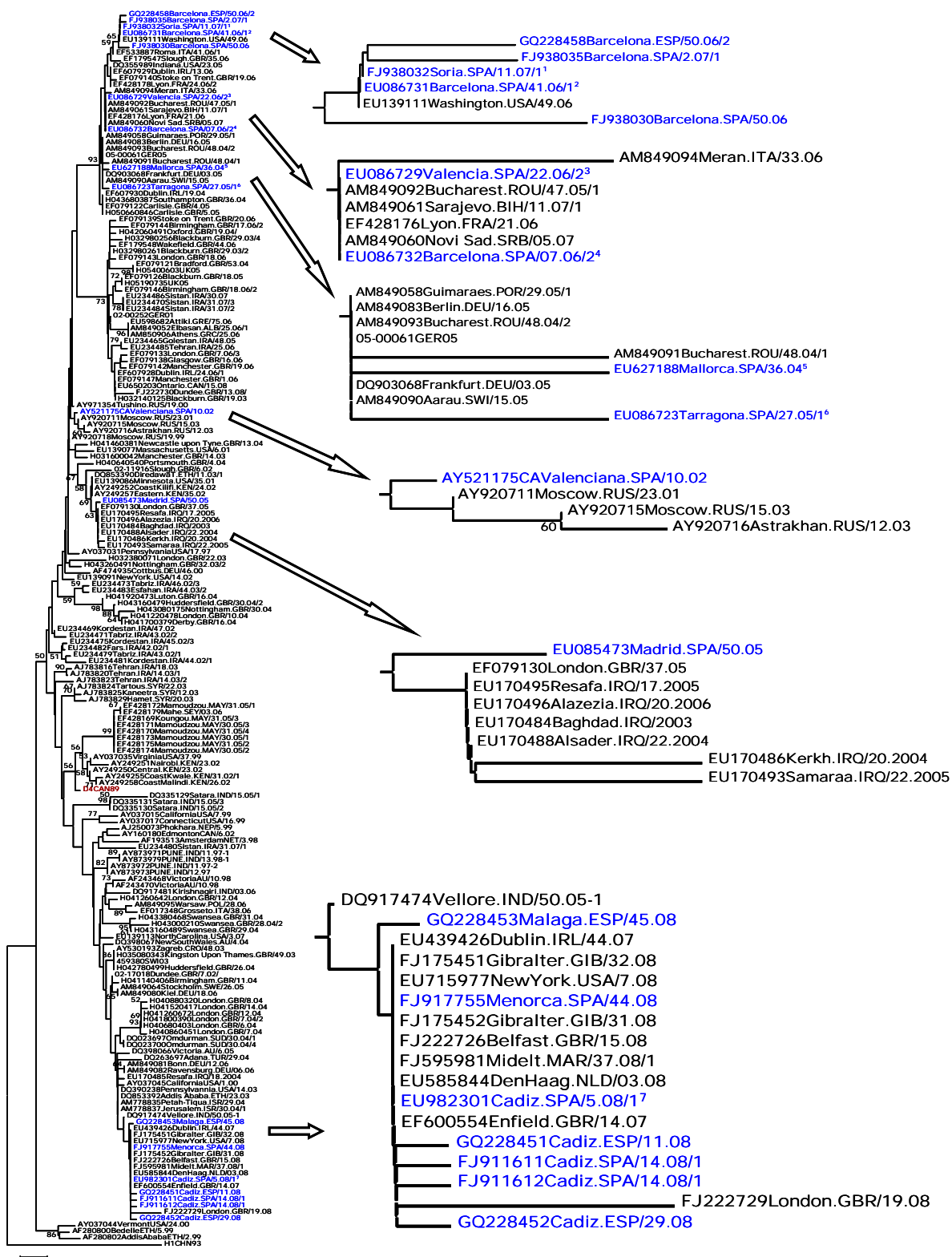
Figura 42. Filograma de secuencias pertenecientes al genotipo D3. Las secuencias españolas están coloreadas en azul, la de referencia en rojo y las obtenidas de la base de datos GenBank en negro. Las de GenBank utilizadas incluyen el número de acceso seguido del lugar de origen, la semana epidemiológica de aparición de síntomas, el año y, en su caso, el número de secuencia de esa semana. En la figura solo se muestran los valores de "bootstrap" mayores de 49.



El único caso de genotipo D3, que ocurrió en Barcelona en el año 2003, era un caso esporádico y no se encontró relación alguna con ningún otro caso de sarampión. En el árbol filogenético de la Figura 42 se puede observar que la secuencia del virus se asemeja a una de Taiwan y otra del Reino Unido del mismo año con un valor de "bootstrapping" de 90. La diferencia entre ellas se encuentra en una sola sustitución nucleotídica, timina por citosina en la posición 453 del fragmento secuenciado, que no da lugar a cambio de aminoácido. Sin embargo, al no conocer los antecedentes epidemiológicos no es posible confirmar que uno u otro puedan ser el origen geográfico del caso.

12. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE GENOTIPO D4

Figura 43. Filograma de secuencias pertenecientes al genotipo D4. Las secuencias españolas están coloreadas en azul, la de referencia en rojo y las obtenidas de la base de datos GenBank en negro. Las de GenBank utilizadas incluyen el número de acceso seguido del lugar de origen, la semana epidemiológica de aparición de síntomas, el año y, en su caso, el número de secuencia de esa semana. En la figura solo se muestran los valores de "bootstrap" mayores de 49.



^{1.} Representa a 9 secuencias ^{2.} Representa a 119 secuencias. ^{3.} Representa a 2 secuencias ^{4.} Representa a 2 secuencias. ^{5.} Representa a 3 secuencias. ^{6.} Representa a 3 secuencias. ^{7.} Representa a 66 secuencias.

A lo largo del período estudiado se han encontrado numerosas variantes de sarampión de genotipo D4. El primero de ellos, un caso esporádico ocurrido en Valencia en el año 2002 que procedía de Ucrania (AY521175 CAValenciana.SPA/10.02), y como se aprecia en la Tabla 22 las secuencias más próximas publicadas en la base de datos GenBank proceden de Rusia.

		Posición nucleotídica		
		264	428	450
Secuenc y cambios nucleotíd	<i>AY521175CAValenciana.SPA/10.02</i>	G	T	G
	<i>AY920711Moscow.RUS/23.01</i>			A
	<i>AY920715Moscow.RUS/15.03</i>		C	A
	<i>AY920716Astrakhan.RUS/12.03/1</i>	A	C	A

Tabla 22. Sustituciones nucleotídicas entre las secuencias de Valencia y Rusia. El número de nucleótido está referido al fragmento del extremo 3' del gen N, de 456 nucleótidos.

Posteriormente, se produjo un brote de cuatro casos en las Islas Baleares en 2004 de origen desconocido (EU627188 Mallorca.SPA/36.04) pero que queda englobada dentro de la rama de cepas europeas de este genotipo (Figura 43).

Otro caso esporádico que fue importado de Gran Bretaña se produjo en Madrid en el año 2005 (EU085473 Madrid.SPA/50.05), el cual tiene un nucleótido de diferencia con la cepa EF079130 London.GBR/37.05. Estos virus D4 tienen una o ninguna mutación comparadas con virus D4 detectados en Kenya (AY249257 Eastern.KEN/35.02) en 2002 y Etiopía en 2003 (DQ853390 DiredawaT.ETH/11.03/1), lo que sugiere su origen en África del Este (Tabla 23). La relación epidemiológica putativa de la cepa EF079130 London.GBR/37.05 con Somalia también sostiene esta hipótesis [43].

		Posiciones nucleotídicas			
		215	308	348	450
Secuencias y cambios nucleotídicos	<i>EU085473Madrid.SPA/50.05</i>	A	C	A	G
	<i>AY249257Eastern.KEN/35.02</i>
	<i>DQ853390DiretawaT.ETH/11.03/1</i>
	<i>EU139086Minnesota.USA/35.01</i>
	<i>EF079130London.GBR/37.05</i>	.	.	A	.
	<i>EU170484Baghdad.IRQ/2003</i>	.	.	A	.
	<i>EU170488Alsader.IRQ/22.2004</i>	.	.	A	.
	<i>EU170495Resafa.IRQ/17.2005</i>	.	.	A	.
	<i>EU170496Alazezia.IRQ/20.2006</i>	.	.	A	.
	<i>AY249252CoastKilifi.KEN/24.02</i>	.	.	G	A
	<i>EU170486Kerh.IRQ/20.2004</i>	.	T	A	.
	<i>EU170493Samaraa.IRQ/22.2005</i>	G	.	A	.

Tabla 23. Sustituciones nucleotídicas entre la secuencia de los brotes de Madrid y Londres del año 2005 y otras secuencias próximas detectadas en otros países. El número de nucleótido está referido al fragmento del extremo 3' del gen N, de 456 nucleótidos.

En ese mismo año se produjo un brote de 3 casos en la provincia de Tarragona (EU086723 Tarragona.SPA/27.05/1) cuyo origen se hallaba en Rumania [162]. En 2006 se produjeron dos brotes en Barcelona, uno a principios de año con un escaso número de pacientes (EU086732 Barcelona.SPA/07.06/2) y origen en Rumania, lo cual se ve reforzado por la similitud de las secuencias estudiadas con la AM849092 Bucharest.ROU/47.05/1 [162], y otro que comenzó a finales de año y continuó durante 2007 afectando a 381 casos. A lo largo del tiempo, durante este último brote se produjeron los cambios en la secuencia original del caso índice que se aprecian en la Tabla 24.

Nº Sec	Secuencia	Nº Acceso GenBank	Sem/año	Cambios nucleotídicos (aminoácidos)* en 456 nt del gen N
				<i>EU086731Barcelona.SPA/41.06/1</i>
116	MVs/Barcelona.SPA/41.06/1	EU086731	41/06-28/07	
1	MVs/Barcelona.SPA/50.06	FJ938030	50/2006	G-a-A 1209 (sin.)
1	MVs/Barcelona.ESP/50.06/2	GQ228458	50/2006	A-a-G 1369 (S457G)
1	MVs/Barcelona.SPA/2.07/1	FJ938035	2/2007	G-a-T 1443, A-a-G 1524 (sin.)

*Los cambios están referidos al gen completo de la nucleoproteína siguiendo la secuencia U01987 Edmonston tipo salvaje.

Tabla 24. Cambios nucleotídicos y aminoacídicos producidos durante el brote de Barcelona 2006-2007.

Uno de los tres primeros casos, procedente de Bosnia, detectados durante este brote había viajado a Italia. El brote está representado en el árbol filogenético por la secuencia (EU086731 Barcelona.SPA/41.06/1) [166], y difería en un nucleótido de las secuencias que causaron una epidemia en la región de Lazio (Italia) en junio-noviembre del año 2006. Este virus se extendió a Cerdeña en agosto de 2006 asociado a la etnia Romaní [154]. Además, se produjo un brote en Soria de 18 casos cuya secuencia, representada por FJ938032Soria.SPA/11.07/1, era igual a la del brote de Barcelona de 2006-2007 (Tabla 25).

	Posición nucleotídica					
	73	172	216	419	423	450
<i>EU086729Valencia.SPA/22.06/2</i>	A	T	G	T	T	G
<i>EU086732Barcelona.SPA/07.06/2</i>
<i>EF428176Lyon.FRA/21.06</i>
<i>AM849060Novi Sad.SRB/05.07*</i>
<i>AM849061Sarajevo.BIH/11.07/1*</i>
<i>AM849092Bucharest.ROU/47.05/1</i>
<i>AM849094Meran.ITA/33.06</i>	C	.
<i>DQ355989Indiana.USA/23.05</i>	A
<i>EF428178Lyon.FRA/24.06/2</i>	A
<i>EF607929Dublin.IRL/13.06</i>	A
<i>EF533887Roma.ITA/41.06/1</i>	.	.	.	C	.	.
<i>EU086731Barcelona.SPA/41.06/1</i>	G	.	.	C	.	.
<i>FJ938032Soria.SPA/11.07/1</i>	G	.	.	C	.	.
<i>EU139111Washington.USA/49.06</i>	G	.	.	C	.	.
<i>EF079140Stoke on Trent.GBR/19.06</i>	.	C	.	.	.	A
<i>EF179547Slough.GBR/35.06</i>	.	.	A	C	.	A

*Las secuencias AM849060 y AM849061 son iguales a una variante del brote de Rumania, AM849092 Bucharest.ROM/47.05, que en Serbia y Bosnia-Herzegovina produjo brotes en el primer cuarto de 2007 debido a población romaní [43].

Tabla 25. Sustituciones nucleotídicas entre la secuencia de los brotes de Barcelona, Soria e Italia del año 2006-2007 y otras secuencias próximas detectadas en otros países. El número de nucleótido está referido al fragmento del extremo 3' del gen N, de 456 nucleótidos.

También es desconocido el origen del último brote de genotipo D4 ocurrido en 2008 en Andalucía, que afectó a 217 casos en Algeciras y La Línea (Cádiz), 16 en Huelva, 3 en Málaga y a 3 en Ceuta puesto que se inició en uno de los barcos que conectan

Algeciras y Ceuta varias veces al día [167]. Las diferencias nucleotídicas del brote de Cádiz-Ceuta con las secuencias genéticamente más próximas en el filograma se muestran en la Tabla 26.

	Posiciones nucleotídicas										
	27	135	142	153	155	164	189	301	310	388	391
Secuencias y cambios nucleotídicos											
<i>EU982301Cádiz.SPA/5.08/1</i>	A	T	G	T	A	T	T	G	G	A	T
<i>FJ917755Menorca.SPA/44.08</i>
<i>FJ175452Gibraltar.GIB/31.08/</i>
<i>FJ595981Midelt.MAR/37.08/1</i>
<i>EF600554Enfield.GBR/14.07</i>
<i>EU439426Dublin.IRL/44.07 EX GER*</i>
<i>EU585844DenHaag.NLD/03.08</i>
<i>EU715977NewYork.USA/7.08 EX ISR**</i>
<i>FJ222726Belfast.GBR/15.08/</i>
<i>DQ917474Vellore.IND/50.05/1</i>	A	.	.	.
<i>GQ228451Cádiz.ESP/11.08</i>	.	.	T
<i>FJ911611Cádiz.SPA/14.08/1</i>	G	.
<i>FJ911612Cádiz.SPA/14.08/2</i>	A	.	.
<i>GQ228452Cádiz.ESP/29.08</i>	G
<i>GQ228453Málaga.ESP/45.08</i>	C
<i>FJ222729London.GBR/19.08/</i>	G	C	.	C	.	C	C	G	.	.	.

*EX GER: Exportada de Alemania a Irlanda [47]. **EX ISR: Exportada de Israel a Estados Unidos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/189498240>).

Tabla 26. Sustituciones nucleotídicas entre la secuencia de los brotes de Cádiz-Ceuta y otras secuencias próximas detectadas en otros países. El número de nucleótido está referido al fragmento del extremo 3' del gen N, de 456 nucleótidos.

Como se puede observar en el año 2008 se produjo un cambio en el tipo de cepa D4 que produjo brotes y casos esporádicos en España, puesto que la del brote de Cádiz-Ceuta, el caso esporádico de Menorca y los casos de Málaga no se parecen a las importadas de Europa del Este que produjeron grandes brotes en 2005-2006. Dado el origen del brote en el ferry que comunica Algeciras con Ceuta, esta cepa D4 podría tener su origen en Marruecos, puesto que, además, es igual a la secuencia de D4 encontrada en Midelt (Marruecos). Sin embargo, también existen secuencias iguales de este mismo año 2008 procedentes de Gibraltar, Gran Bretaña, Holanda y EEUU (importada desde Israel), así como una exportada a la República de Irlanda desde Alemania en 2007. Por otro lado, el caso de Menorca es un caso importado de Londres. Cabe preguntarse si en el futuro estas secuencias D4 comenzarán o no a circular por Europa. Aunque de hecho, en el momento de escribir esta tesis en el año

2009 ya se habían producido casos de D4 similares a una secuencia procedente de Gran Bretaña en Granada.

En la Tabla 27 se recogen las mutaciones detectadas a lo largo del brote en la que se observan cuatro mutaciones que producen cambio de aminoácido. Las tres secuencias del brote de Málaga poseen una mutación silenciosa característica en la posición 1513.

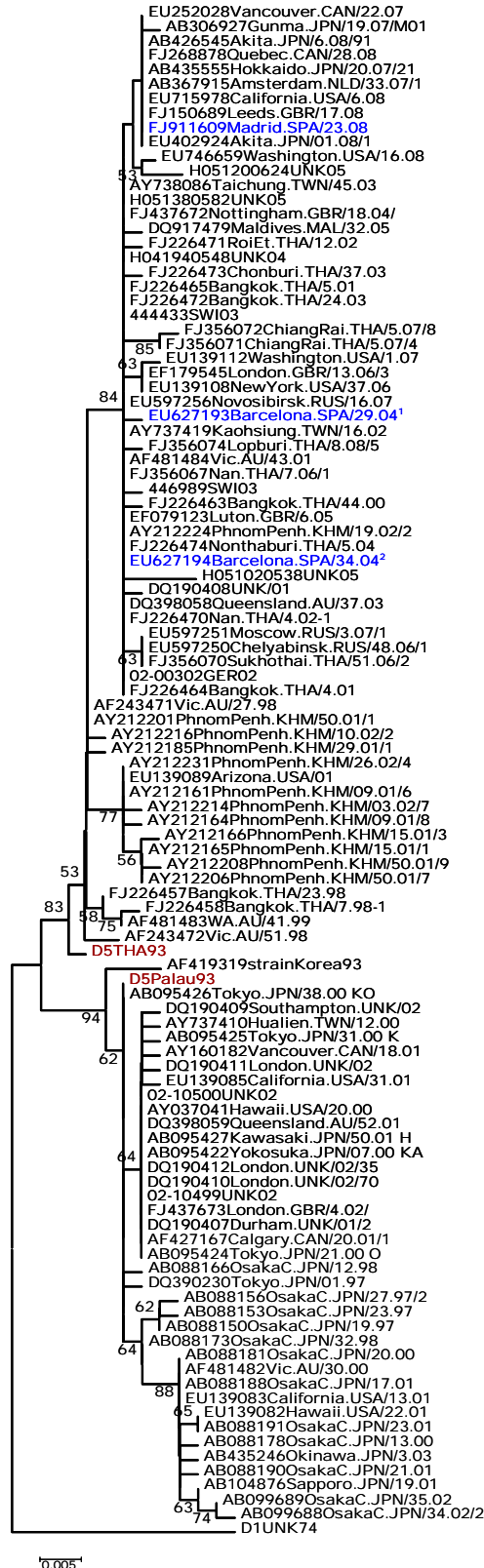
<i>Nº Secuencias</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Nº Acceso GenBank</i>	<i>Sem/año</i>	<i>Cambios nucleotídicos (aminoácidos) * en 456 nt del gen N</i>
				<i>MVs/Cádiz.SPA/5.08/1</i>
66	MVs/Cádiz.SPA/5.08/1	EU982301	5-40/2008	
2	MVs/Cádiz.ESP/11.08	GQ228451	11 y 13/2008	G-a-T 1264 (G422C)
1	MVs/Cádiz.SPA/14.08/1	FJ911611	14/2008	A-a-G 1510 (I504V)
2	MVs/Cádiz.SPA/14.08/2	FJ911612	22 y 23/2008	G-a-A 1432 (A478T)
2	MVs/Cádiz.ESP/29.08	GQ228452	27 y 29/2008	A-a-G 1277 (E426G)
3	MVs/Málaga.ESP/45.08	GQ228453	45-49/2008	T-a-C 1513 (sin.)

*Los cambios están referidos al gen completo de la nucleoproteína siguiendo la secuencia U01987 Edmonston tipo salvaje.

Tabla 27. Cambios nucleotídicos y aminoácidos producidos durante el brote de Algeciras (Cádiz) en 2008.

13. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE GENOTIPO D5

Figura 44. Filograma de secuencias pertenecientes al genotipo D5. Las secuencias españolas están coloreadas en azul, las de referencia en rojo y las obtenidas de la base de datos GenBank en negro. Las de GenBank utilizadas incluyen el número de acceso seguido del lugar de origen, la semana epidemiológica de aparición de síntomas, el año y, en su caso, el número de secuencia de esa semana. En la figura solo se muestran los valores de "bootstrap" mayores de 49.



¹Representa a 3 secuencias. ² Representa a 4 secuencias.

En el año 2004 se produjo un brote de genotipo D5 en Barcelona que afectó a seis pacientes y que está representado en el filograma por la secuencia EU627194 Barcelona.SPA/34.04 que se asemeja a secuencias procedentes de Camboya, Tailandia o Taiwan y cuyo caso índice había viajado a Bangkok (Tailandia). Durante el mismo año otro brote que afectó a 8 personas se detectó en el barrio Zona Franca de Barcelona, el caso índice no se pudo identificar. La secuencia de este segundo brote (EU627194 Barcelona.SPA/29.04) también es similar a secuencias procedentes de Camboya, Tailandia o Taiwan, tal y como se muestra en la Tabla 28, aunque contiene un residuo diferente en la posición 405.

		Posiciones nucleotídicas																	
		189	207	252	253	274	285	290	298	316	329	336	344	368	369	384	405	414	441
Secuencias y cambios nucleotídicos	EU627194Barcelona.SPA/34.04	T	T	A	G	C	C	C	G	G	A	G	G	G	G	A	C	G	A
	EU627193Barcelona.SPA/29.04	A	.	.
	FJ226464Bangkok.THA/4.01
	FJ226465Bangkok.THA/5.01
	FJ226472Bangkok.THA/24.03
	FJ226470Nan.THA/4.02-1
	FJ226474Nonthaburi.THA/5.04
	FJ356067Nan.THA/7.06/1
	AY212224PhnomPenh.KHM/19.02/2
	AY737419Kaohsiung.TWN/16.02
	AY738086Taichung.TWN/45.03
	02-00302GER02
	444433SWI03
	DQ398058Queensland.AU/37.03
	AF481484Vic.AU/43.01 EX THA*
	EF079123Luton.GBR/6.05
	EU597256Novosibirsk.RUS/16.07
	FJ437672Nottingham.GBR/18.04/
	H041940548UNK04
	H051380582UNK05
	446989SWI03	T
	DQ190408UNK/01	.	C
	DQ917479Maldives.MAL/32.05	G
	EF179545London.GBR/13.06/3	A	.	.	.
	EU139108NewYork.USA/37.06	A	.	.	.
	FJ356074Lopburi.THA/8.08/5	G	.	.
	EU597250Chelyabinsk.RUS/48.06/1	.	.	.	T
	EU597251Moscow.RUS/3.07/1	.	.	.	T
	FJ356070Sukhothai.THA/51.06/2	.	.	.	T
	FJ226463Bangkok.THA/44.00	A
	FJ226471RoiEt.THA/12.02	T
	FJ226473Chonburi.THA/37.03	A
EU139112Washington.USA/1.07	A	.	.	A	
FJ356071ChiangRai.THA/5.07/4	C	.	G	
FJ356072ChiangRai.THA/5.07/8	C	.	G	A	
H051020538UNK05	A	C	A	C	.	

*EX THA: Exportada de Tailandia a Australia [168].

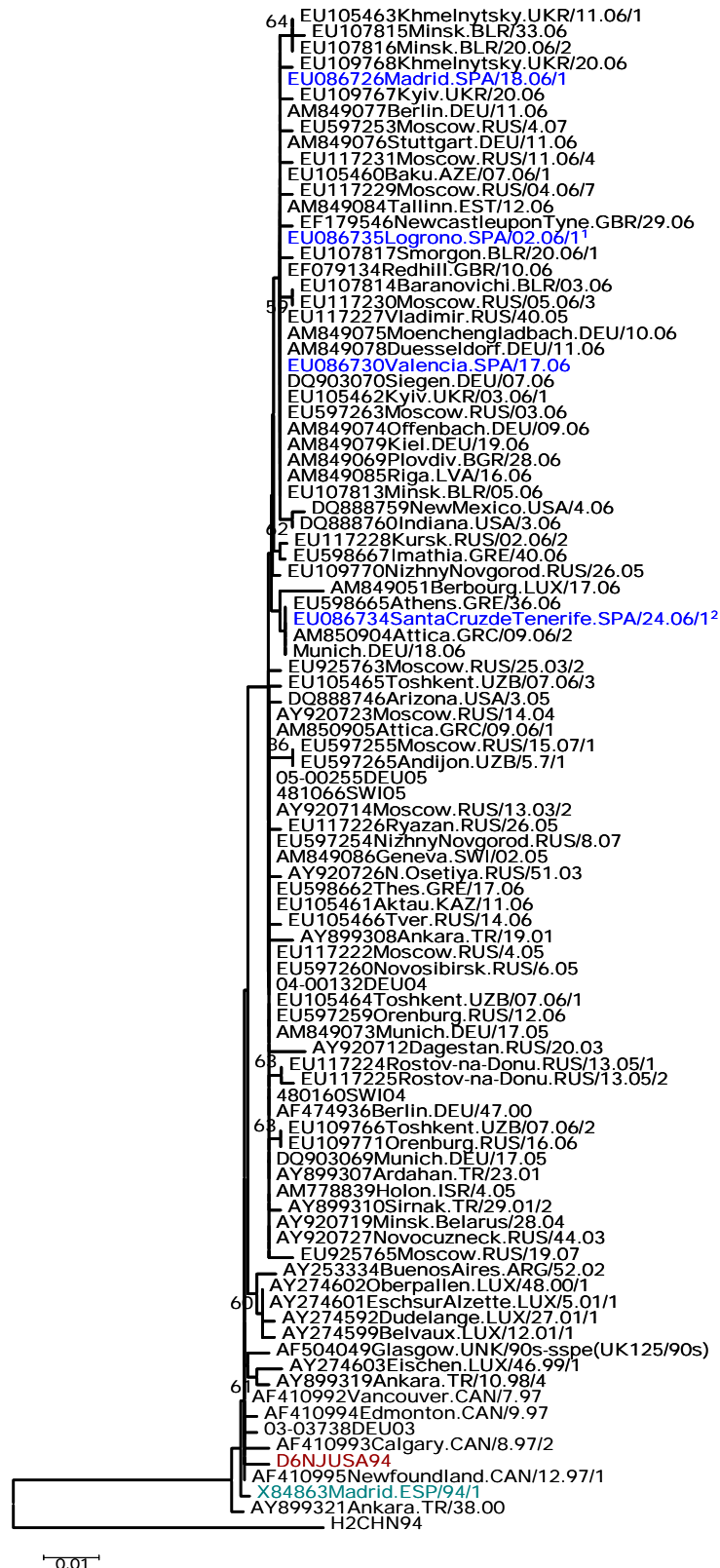
Tabla 28. Sustituciones nucleotídicas entre las secuencias de los brotes de Barcelona y otras secuencias próximas detectadas en otros países. El número de nucleótido está referido al fragmento del extremo 3' del gen N, de 456 nucleótidos.

En el año 2008 se detectó una secuencia de genotipo D5 en Madrid en un paciente que había viajado a Londres durante el período de incubación y que no produjo

ningún caso secundario (FJ911609Madrid.SPA/23.08). Dicha secuencia era idéntica a las secuencias FJ268878 Quebec.CAN/28.08_D5, FJ150689 Leeds.GBR/17.08 (importada desde Francia), EU715978 California.USA/6.08 (importada desde Suiza), EU402924 Akita.JPN/01.08/1, EU252028 Vancouver.CAN/22.07, AB435555 Hokkaido.JPN/20.07/21, AB426545 Akita.JPN/6.08/91, AB367915 Amsterdam.NLD/33.07/1, que se encuentran próximas en el filograma; sin embargo presentaba una variación nucleotídica T24C con respecto a la secuencia AB306927 Gunma.JPN/19.07/M01_D5.

14. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE GENOTIPO D6

Figura 45. Filograma de secuencias pertenecientes al genotipo D6. Las secuencias españolas obtenidas en este estudio están coloreadas en azul, la de referencia en rojo, una secuencia española del año 94 se muestra en verde y las obtenidas de la base de datos GenBank en negro. Las de GenBank utilizadas incluyen el número de acceso seguido del lugar de origen, la semana epidemiológica de aparición de síntomas, el año y, en su caso, el número de secuencia de esa semana. En la figura solo se muestran los valores de "bootstrap" mayores de 49.



En el año 2006 se produjeron dos casos esporádicos de sarampión genotipo D6, uno en Valencia (EU086730 Valencia.SPA/17.06) y otro en Madrid (EU086726 Madrid.SPA/18.06/1). Los dos brotes que también se detectaron ocurrieron en Logroño (La Rioja) en diciembre de 2005 y enero de 2006 [169], representado por la secuencia EU086735 Logroño.SPA/02.06/1; y en Santa Cruz de Tenerife (Islas Canarias), representado por la secuencia EU086734 Santa Cruz de Tenerife.SPA/24.06/1.

La variante denominada D6-2005 [43], que causó un brote de más de 46.000 casos en Ucrania entre el último cuarto de 2005 y octubre de 2006 fue identificada en primer lugar en la Federación Rusa en el último cuarto del 2005 (EU117227 Vladimir.RUS/40.05). Los casos esporádicos de Valencia y Madrid presentan una secuencia similar a EU117227 Vladimir.RUS/40.05 y tienen antecedente epidemiológico con Ucrania (Tabla 29). De la misma manera la secuencia encontrada en el brote de Logroño era igual a la secuencia ucraniana, aunque no se pudo encontrar relación epidemiológica [43]. Es de destacar que esta misma secuencia, aparte de en Ucrania también fue detectada en otros países y particularmente en Alemania [170, 171].

		Posiciones nucleotídicas											
		72	145	146	233	249	293	332	352	377	393	416	442
Secuencias y cambios nucleotídicos	<i>EU086726Madrid.SPA/18.06/1</i>	A	G	A	G	C	C	T	G	C	G	A	G
	<i>EU086730Valencia.SPA/17.06</i>
	<i>EU086735Logrono.SPA/02.06/1</i>
	<i>EU117227Vladimir.RUS/40.05</i>
	<i>AM849069Plovdiv.BGR/28.06</i>
	<i>AM849074Offenbach.DEU/09.06</i>
	<i>AM849075Moenchengladbach.DEU/10.06</i>
	<i>AM849076Stuttgart.DEU/11.06</i>
	<i>AM849077Berlin.DEU/11.06</i>
	<i>AM849078Duesseldorf.DEU/11.06</i>
	<i>AM849079Kiel.DEU/19.06</i>
	<i>AM849084Tallinn.EST/12.06</i>
	<i>AM849085Riga.LVA/16.06</i>
	<i>DQ903070Siegen.DEU/07.06</i>
	<i>EF079134Redhill.GBR/10.06</i>
	<i>EU105460Baku.AZE/07.06/1</i>
	<i>EU105462Kyiv.UKR/03.06/1</i>
	<i>EU107813Minsk.BLR/05.06</i>
	<i>EU597263Moscow.RUS/03.06</i>
	<i>DQ888760Indiana.USA/3.06</i>	A
	<i>EF179546NewcastleuponTyne.GBR/29.06</i>	T
	<i>EU105463Khmelnysky.UKR/11.06/1</i>	T
	<i>EU107814Baranovichi.BLR/03.06</i>	C
	<i>EU107816Minsk.BLR/20.06/2</i>	T
	<i>EU107817Smorgon.BLR/20.06/1</i>	G
	<i>EU109767Kyiv.UKR/20.06_D6</i>	.	.	G
	<i>EU109768Khmelnysky.UKR/20.06</i>	.	T
	<i>EU117229Moscow.RUS/04.06/7</i>	A	.	.
<i>EU117230Moscow.RUS/05.06/3</i>	C	
<i>EU597253Moscow.RUS/4.07</i>	T	
<i>DQ888759NewMexico.USA/4.06</i>	A	.	.	.	A	
<i>EU107815Minsk.BLR/33.06</i>	T	.	G	.	.	

Tabla 29. Sustituciones nucleotídicas entre la secuencia de los brotes de Madrid y Logroño, un caso esporádico de Valencia y otras secuencias próximas detectadas en otros países. El número de nucleótido está referido al fragmento del extremo 3´ del gen N, de 456 nucleótidos.

En lo que se refiere al brote de Santa Cruz de Tenerife, afectó a tres hermanos de origen alemán y la secuencia es igual a la encontrada en Alemania: MVs/Munich.DEU/18.06 (Tabla 30) [43].

		Posición nucleotídica			
		24	172	173	189
Secuencias y cambios nucleotídicos	<i>EU086734SantaCruzdeTenerife.SPA/24.06/1</i>	T	T	T	T
	<i>MVs/Munich.DEU/18.06_D6</i>
	<i>AM850904Attica.GRC/09.06/2</i>
	<i>EU598665Athens.GRE/36.06</i>
	<i>AM849051Berbourg.LUX/17.06</i>	G	C	C	C

Tabla 30. Sustituciones nucleotídicas entre la secuencia del brote de Santa Cruz de Tenerife y otras secuencias próximas detectadas en otros países. El número de nucleótido está referido al fragmento del extremo 3´ del gen N, de 456 nucleótidos.

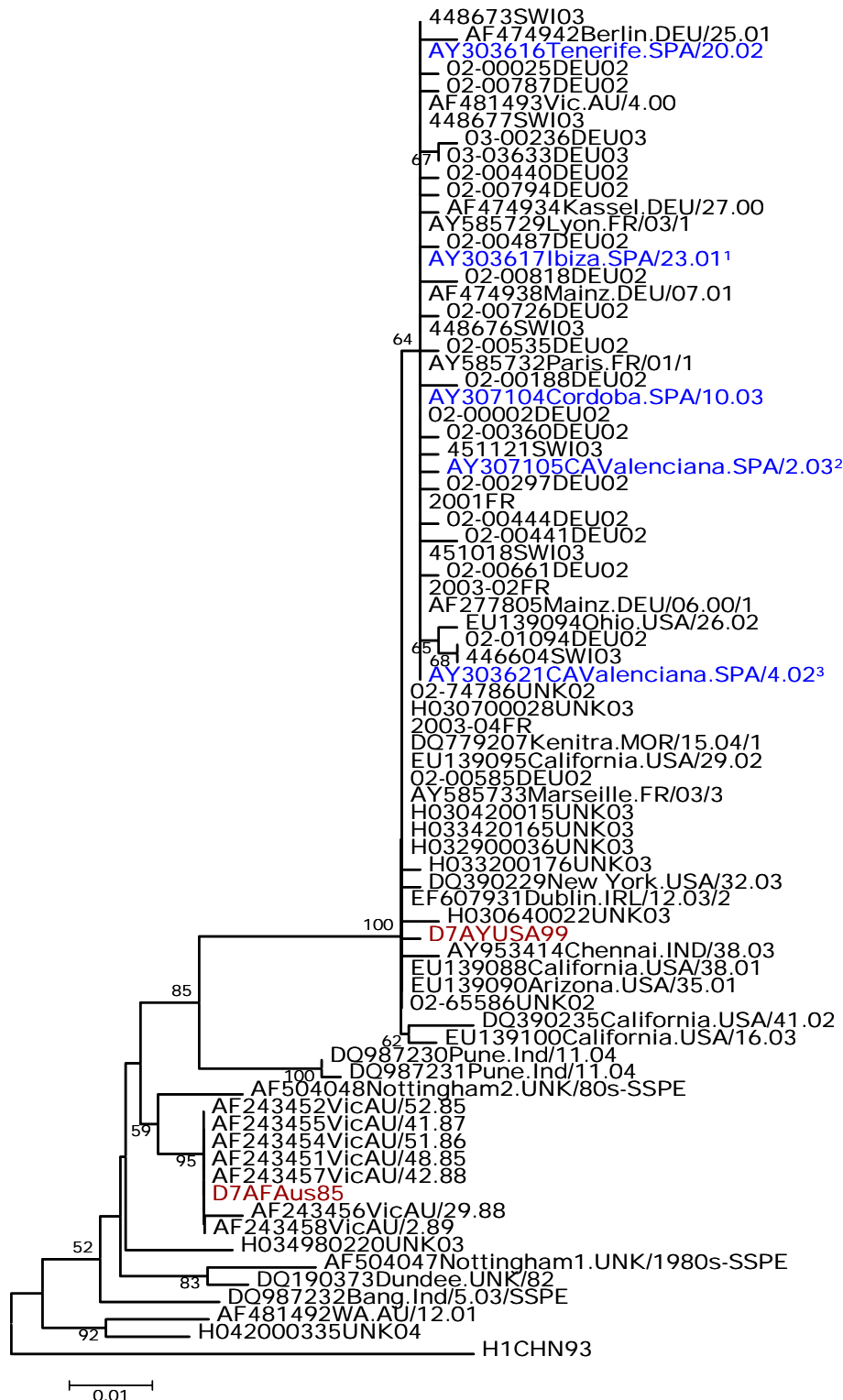
Por último, conviene destacar que todas las secuencias D6 encontradas en España en el año 2006 son diferentes a la que circuló en nuestro país desde 1993 hasta 1997 (X84863 Madrid.ESP/94/1) como se observa en el filograma y en la Tabla 31 [163, 164].

		Posiciones nucleotídicas				
		24	105	168	229	308
Secuencias y cambios nucleotídicos	<i>EU086726Madrid.SPA/18.06/1</i>	G	A	A	T	A
	<i>EU086730Valencia.SPA/17.06</i>
	<i>EU086735Logrono.SPA/02.06/1</i>
	<i>EU086734SantaCruzdeTenerife.SPA/24.06/1</i>	T	.	.	C	.
	<i>X84863Madrid.ESP/94/1</i>	T	G	C	.	C

Tabla 31. Sustituciones nucleotídicas entre las secuencias españolas de 2006 y la que circuló durante los años 1993-1997. El número de nucleótido está referido al fragmento del extremo 3' del gen N, de 456 nucleótidos.

15. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE GENOTIPO D7

Figura 46. Filograma de secuencias pertenecientes al genotipo D7. Las secuencias españolas están coloreadas en azul, las de referencia en rojo y las obtenidas de la base de datos GenBank en negro. Las de GenBank utilizadas incluyen el número de acceso seguido del lugar de origen, la semana epidemiológica de aparición de síntomas, el año y, en su caso, el número de secuencia de esa semana. En la figura solo se muestran los valores de "bootstrap" mayores de 49.



¹. Representa a 4 secuencias. ². Representa a 2 secuencias. ³. Representa a 5 secuencias.

En lo que se refiere al genotipo D7 es de destacar que se presentó en España entre los años 2001-2003 y posteriormente no volvió a producir ni casos esporádicos ni brotes. Este es el mismo período de tiempo que este genotipo estuvo circulando por los países de la Región Europea de la OMS (Tabla 32) [43]. El brote de Ibiza del año 2001 (AY303617 Ibiza.SPA/23.01) afectó a 8 pacientes y su origen era desconocido. Los casos esporádicos que produjo este genotipo se localizaron en Los Cristianos (Tenerife) (AY303616 Tenerife.SPA/20.02) en 2002 y en Córdoba en 2003 (AY307104 Córdoba.SPA/10.03). El brote de Valencia del año 2002, representado por la secuencia AY303621 CAValenciana.SPA/4.02 y cuyo origen epidemiológico era Bosnia, afectó a 15 casos. Mientras que el de 2003, también en Valencia (AY307105 CAValenciana.SPA/2.03), afectó a dos familiares exclusivamente sin que se conozca su lugar de origen.

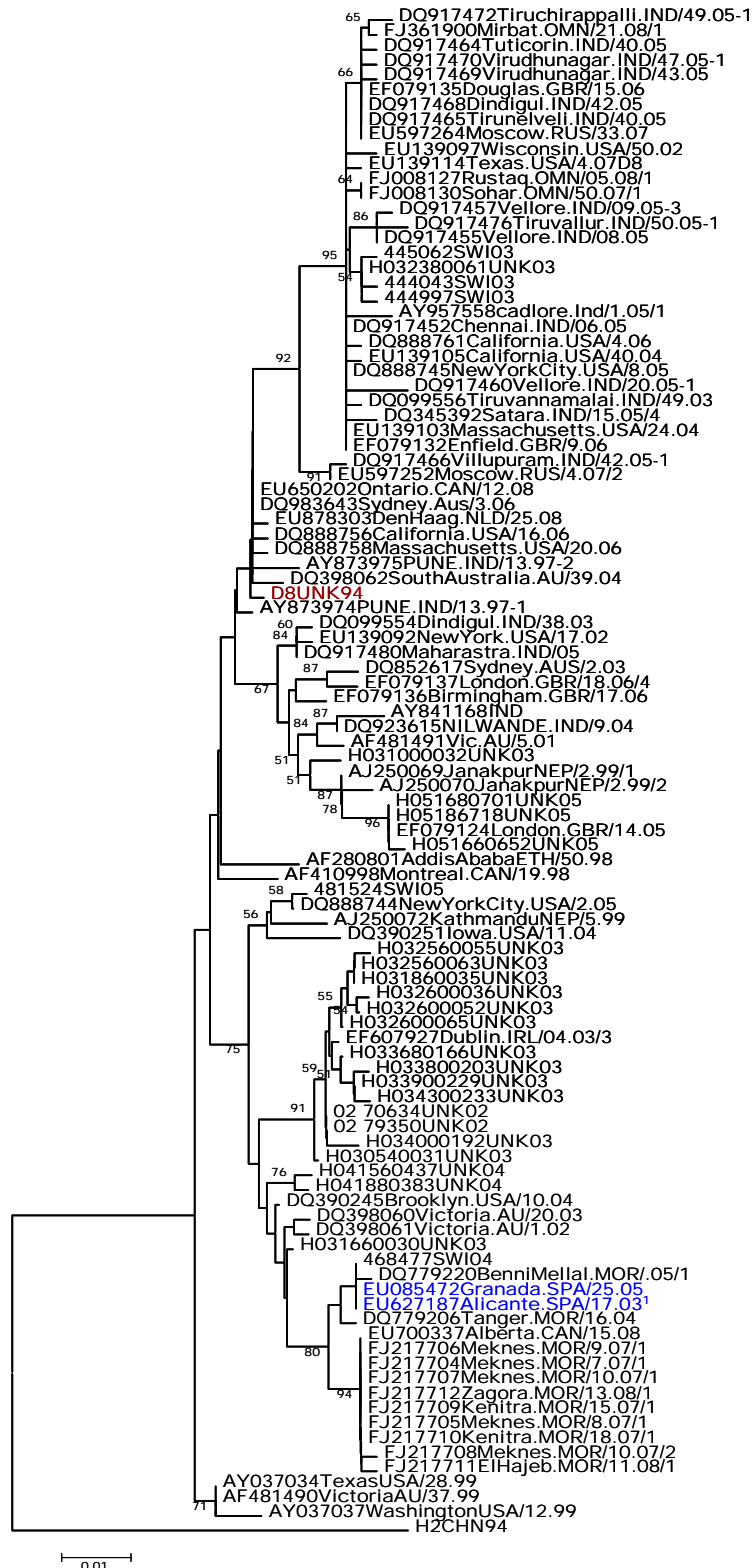
	Posiciones nucleotídicas																																			
	1	13	17	33	57	78	126	135	147	148	159	187	197	229	244	248	256	258	295	319	323	328	344	353	376	423	431									
AY307104Córdoba.SPA/10.03	A	A	T	T	T	T	A	T	T	C	T	G	T	T	T	G	A	T	C	T	G	G	G	C	G	T	A									
AY303617Ibiza.SPA/23.01								
AY303616Tenerife.SPA/20.02								
AY303621CAValenciana.SPA/4.02								
AY307105CAValenciana.SPA/2.03	C								
02-00002DEU02								
2001FR								
2003-02FR								
448673SWI03								
448676SWI03								
448677SWI03								
451018SWI03								
AF277805Mainz.DEU/06.00/1								
AF474938Mainz.DEU/07.01								
AF481493Vic.AU/4.00 EX LKA*								
AY585729Lyon.FR/03/1								
AY585732Paris.FR/01/1								
02-00025DEU02	.	.	T								
02-00297DEU02	C								
02-00360DEU02	T								
02-00440DEU02	F								
02-00444DEU02	T	.	.								
02-00487DEU02	C								
02-00535DEU02	A								
02-00661DEU02	A								
02-00726DEU02	A								
02-00787DEU02	G								
02-00794DEU02	C								
03-03633DEU03	C								
451121SWI03	C								
AF474934Kassel.DEU/27.00	A	.	.								
AF474942Berlin.DEU/25.01	C	C								
EU139094Ohio.USA/26.02	G	C								
02-00188DEU02	T	.	A								
02-00441DEU02	.	.	A	T								
02-00818DEU02								
02-01094DEU02	C	C	C	.								
03-00236DEU03	C	.	.	T								
446604SWI03	.	.	.	C	C								

*EX LKA: Exportada a Australia desde Sri Lanka [168].

Tabla 32. Sustituciones nucleotídicas entre las secuencias D7 españolas y otras secuencias próximas detectadas en otros países. El número de nucleótido está referido al fragmento del extremo 3' del gen N, de 456 nucleótidos.

16. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE GENOTIPO D8

Figura 47. Filograma de secuencias pertenecientes al genotipo D8. Las secuencias españolas están coloreadas en azul, la de referencia en rojo y las obtenidas de la base de datos GenBank en negro. Las de GenBank utilizadas incluyen el número de acceso seguido del lugar de origen, la semana epidemiológica de aparición de síntomas, el año y, en su caso, el número de secuencia de esa semana. En la figura solo se muestran los valores de "bootstrap" mayores de 49.



¹. Representa a 6 secuencias.

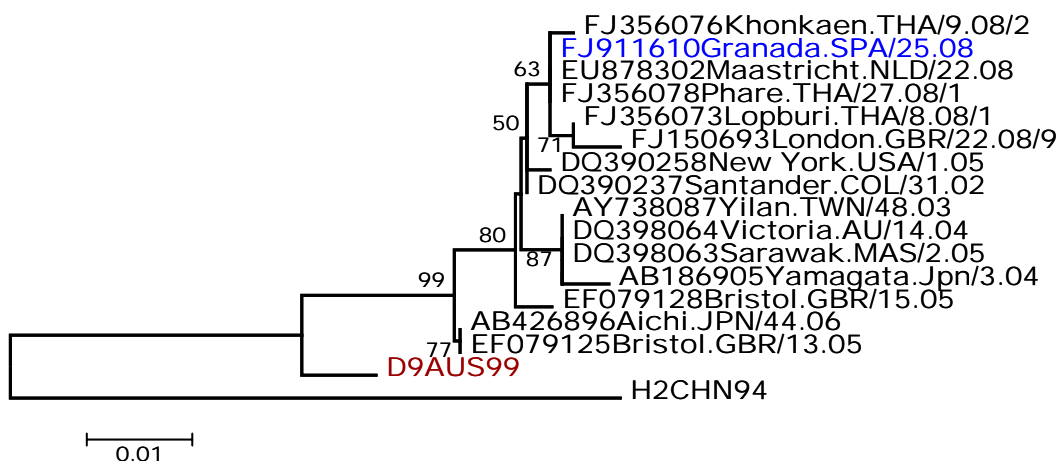
En el año 2003 se produjo un brote de sarampión genotipo D8 en Benidorm (Alicante) debido a la cepa EU627187 Alicante.SPA/17.03 que afectó a 9 casos y cuyo origen era desconocido. En el 2005 se detectó un caso esporádico en Granada (EU085472 Granada.SPA/25.05), también de origen desconocido. En el filograma se puede observar que ambas secuencias se asemejan a una secuencia de Marruecos del año 2005 (DQ779220), de la que difieren en una posición y a otra de 2004 de la que difieren en dos [159]. Las secuencias de Benidorm 2003, Granada 2005 y una procedente de Suiza del 2004 son idénticas, como se aprecia en la Tabla 33. Las secuencias marroquíes de los años 2007 y 2008 presentan más cambios, y en el árbol filogenético se asocian a las españolas con un valor de "bootstrap" del 80%.

		Posición nucleotídica						
		60	396	414	430	447	448	450
Secuencias y cambios nucleotídicos	<i>EU085472Granada.SPA/25.05</i>	T	A	G	T	T	T	G
	<i>EU627187Alicante.SPA/17.03</i>
	<i>468477SWI04</i>
	<i>DQ779220BenniMellal.MOR/.05/1</i>	C
	<i>DQ779206Tanger.MOR/16.04</i>	.	T	A
	<i>EU700337Alberta.CAN/15.08</i>	C	.	A	.	.	C	A
	<i>FJ217704Meknes.MOR/7.07/1</i>	C	.	A	.	.	C	A
	<i>FJ217705Meknes.MOR/8.07/1</i>	C	.	A	.	.	C	A
	<i>FJ217706Meknes.MOR/9.07/1</i>	C	.	A	.	.	C	A
	<i>FJ217707Meknes.MOR/10.07/1</i>	C	.	A	.	.	C	A
	<i>FJ217708Meknes.MOR/10.07/2</i>	C	.	A	C	.	C	A
	<i>FJ217709Kenitra.MOR/15.07/1</i>	C	.	A	.	.	C	A
	<i>FJ217710Kenitra.MOR/18.07/1</i>	C	.	A	.	.	C	A
	<i>FJ217711ElHajeb.MOR/11.08/1</i>	C	.	A	.	C	C	A
<i>FJ217712Zagora.MOR/13.08/1</i>	C	.	A	.	.	C	A	

Tabla 33. Sustituciones nucleotídicas entre las secuencias D8 españolas y otras secuencias próximas detectadas en otros países. El número de nucleótido está referido al fragmento del extremo 3' del gen N, de 456 nucleótidos.

17. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE GENOTIPO D9

Figura 48. Filograma de secuencias pertenecientes al genotipo D9. Las secuencias españolas están coloreadas en azul, la de referencia en rojo y las obtenidas de la base de datos GenBank en negro. Las de GenBank utilizadas incluyen el número de acceso seguido del lugar de origen, la semana epidemiológica de aparición de síntomas, el año y, en su caso, el número de secuencia de esa semana. En la figura solo se muestran los valores de "bootstrap" mayores de 49.



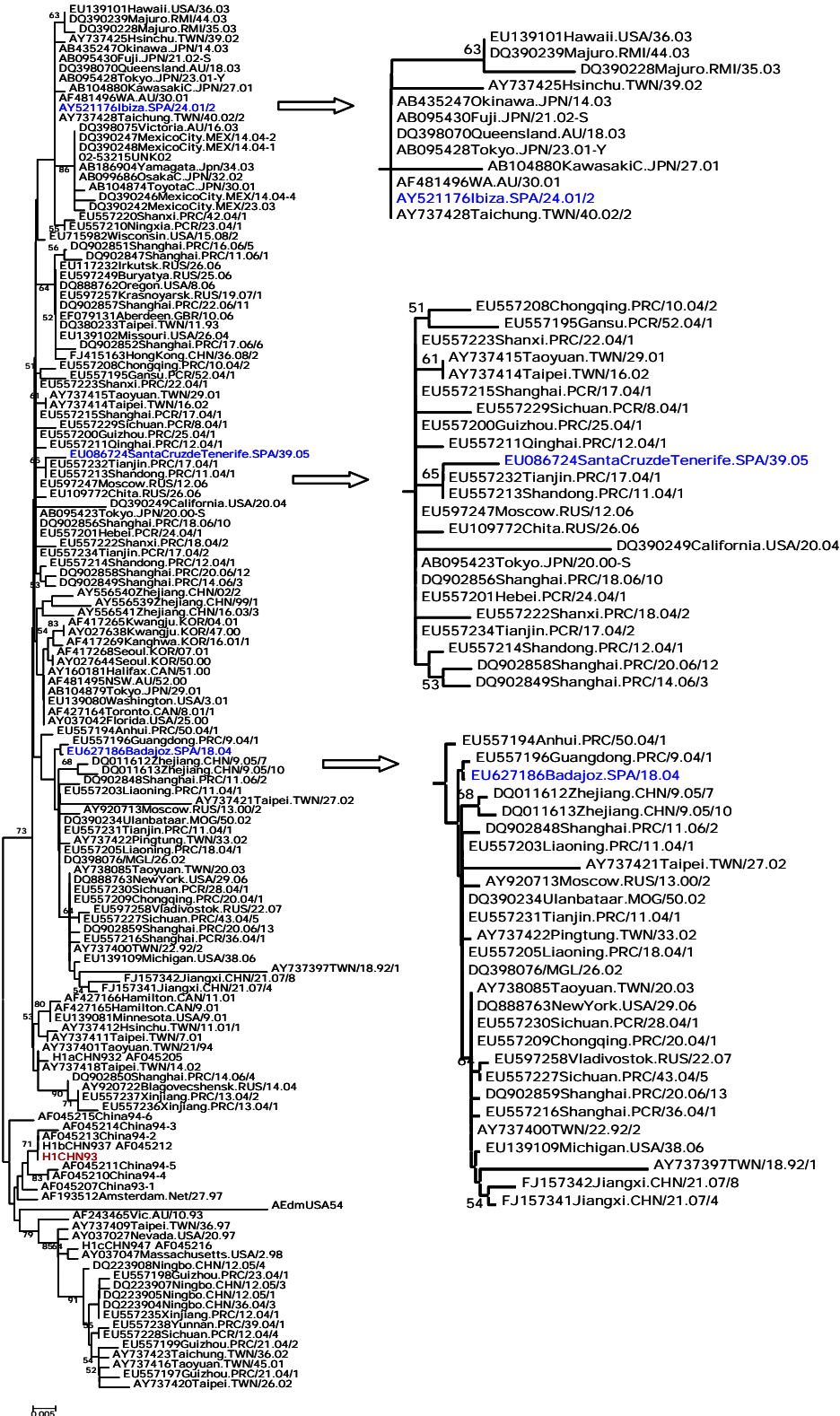
El caso de genotipo D9 encontrado en Granada en el año 2008 se detectó durante el estudio del brote de Algeciras (genotipo D4), y gracias al análisis filogenético se pudo descartar como perteneciente a dicho brote. Se trataba de un paciente que vivía en Madrid y había viajado recientemente a Portugal e Italia. Posteriormente, asociado a este paciente, se produjo un único caso secundario dentro del núcleo familiar. En el árbol filogenético se puede observar que se agrupa con una secuencia de un virus procedente de Tailandia y otro de Holanda del año 2008 (Tabla 34), aunque no existen datos epidemiológicos que puedan apoyar uno u otro origen.

		Posición nucleotídica					
		13	174	183	302	319	339
Secuencias y cambios nucleotídicos	<i>FJ911610Granada.SPA/25.08</i>	G	G	G	T	T	C
	<i>FJ356078Phare.THA/27.08/1</i>
	<i>EU878302Maastricht.NLD/22.08</i>
	<i>FJ356076Khonkaen.THA/9.08/2</i>	A
	<i>FJ356073Lopburi.THA/8.08/1</i>	.	A
	<i>FJ150693London.GBR/22.08/9</i>	.	A	.	C	C	.
	<i>DQ390258New York.USA/1.05</i>	A	.	A	.	.	.
	<i>DQ390237Santander.COL/31.02</i>	A

Tabla 34. Sustituciones nucleotídicas entre la secuencia D9 de Granada y otras secuencias próximas detectadas en otros países. El número de nucleótido está referido al fragmento del extremo 3' del gen N, de 456 nucleótidos.

18. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE GENOTIPO H1

Figura 49. Filograma de secuencias pertenecientes al genotipo H1. Las secuencias españolas están coloreadas en azul, la de referencia en rojo y las obtenidas de la base de datos GenBank en negro. Las de GenBank utilizadas incluyen el número de acceso seguido del lugar de origen, la semana epidemiológica de aparición de síntomas, el año y, en su caso, el número de secuencia de esa semana. En la figura solo se muestran los valores de "bootstrap" mayores de 49.



De los casos de genotipo H1 detectados en España en el período 2001-2008 dos de ellos se dieron en niñas adoptadas procedentes de China a su llegada a España, correspondiendo a las secuencias AY521176 Ibiza.SPA/24.01/2 y EU627186 Badajoz.SPA/18.04, mientras que el tercero se produjo en una niña española sin ninguna conexión aparente con otros casos de sarampión, cuya secuencia es EU086724 Santa Cruz de Tenerife.SPA/39.05.

La secuencia encontrada en Ibiza al mismo tiempo que se detectó el brote de D4 del año 2001 es idéntica a cepas procedentes de Japón, incluida una detectada en Australia que procedía de Japón (AF481496WA.AU/30.01) [168], y a una de las secuencias detectadas en la República de las Islas Marshall (Tabla 35). La secuencia EU086724 Santa Cruz de Tenerife.SPA/39.05 se diferencia en dos nucleótidos de dos secuencias detectadas en China, aunque como se ha mencionado no presenta antecedente epidemiológico conocido de contacto con población de origen chino o viaje a algún país con circulación de genotipo H1 (Tabla 36). Finalmente, la secuencia detectada en China, EU557196 Guangdong.PRC/9.04/1, es la más próxima a la española detectada en Badajoz con solamente un nucleótido de diferencia entre ambas (Tabla 37).

		Posición nucleotídica			
		63	168	190	447
Secuencias y cambios nucleotídicos	<i>AY521176Ibiza.SPA/24.01/2</i>	A	G	A	T
	<i>AB095428Tokyo.JPN/23.01-Y</i>
	<i>AB095430Fuji.JPN/21.02-S</i>
	<i>AB435247Okinawa.JPN/14.03</i>
	<i>AF481496WA.AU/30.01 EX JPN*</i>
	<i>AY737428Taichung.TWN/40.02/2</i>
	<i>DQ390239Majuro.RMI/44.03</i>
	<i>DQ398070Queensland.AU/18.03</i>	G	.	.	.
	<i>EU139101Hawaii.USA/36.03</i>	G	.	.	.
	<i>AB104880KawasakiC.JPN/27.01</i>	.	.	G	.
	<i>AY737425Hsinchu.TWN/39.02</i>	.	T	.	.
	<i>DQ390228Majuro.RMI/35.03</i>	G	.	.	C

*EX JPN: Exportada desde Japón a Australia [168].

Tabla 35. Sustituciones nucleotídicas entre la secuencia H1 de Ibiza y otras secuencias próximas detectadas en otros países. El número de nucleótido está referido al fragmento del extremo 3' del gen N, de 456 nucleótidos.

		Posiciones nucleotídicas																							
		18	24	123	177	195	197	201	218	220	238	246	247	272	282	315	319	328	342	372	386	412	418	433	451
Secuencias y cambios nucleotídicos	EU086724SantaCruzdeTenerife.SPA/39.05	G	T	C	G	A	T	A	C	G	G	C	A	C	A	G	T	G	T	G	G	A	A	A	G
	EU557213Shandong.PRC/11.04/1	G	A
	EU557232Tanjin.PRC/17.04/1	G	A
	AB095423Tokyo.JPN/20.00-5	G	A
	DQ902856Shanghai.PRC/18.06/10	G	A
	EU557200Guizhou.PRC/25.04/1	G	A
	EU557201Hebei.PCR/24.04/1	G	A
	EU557215Shanghai.PCR/17.04/1	G	A
	EU557223Shanxi.PRC/22.04/1	G	A
	EU557234Tanjin.PRC/17.04/2	G	A
	EU597247Moscow.RUS/12.06	G	A
	AY737414Taipei.TWN/16.02	G	A	A
	AY737415Taoyuan.TWN/29.01	G	A	A
	DQ390249California.USA/20.04	.	.	.	A	G	C	G	T	A	A	.	.	T	.	.	.	A	.	A
	DQ902849Shanghai.PRC/14.06/3	.	C	.	.	G	A	A	T
	DQ902858Shanghai.PRC/20.06/12	G	A	A	T	A
	EU109772Chita.RUS/26.06	A	.	.	.	G	A	A
	EU557195Gansu.PCR/52.04/1	.	.	T	.	G	A	A	C	C
	EU557208Chongqing.PRC/10.04/2	G	A	A	C	.	.	A
	EU557211Qinghai.PRC/12.04/1	G	A	A	C
EU557214Shandong.PRC/12.04/1	.	C	.	.	G	A	A	
EU557222Shanxi.PRC/18.04/2	G	A	A	C	.	C	
EU557229Sichuan.PCR/8.04/1	G	A	A	.	G	.	G	

Tabla 36. Sustituciones nucleotídicas entre la secuencia H1 de Santa Cruz de Tenerife y otras secuencias próximas detectadas en otros países. El número de nucleótido está referido al fragmento del extremo 3' del gen N, de 456 nucleótidos.

	Posiciones nucleotídicas																																																					
	28	52	55	135	138	149	150	156	159	162	187	190	191	204	209	225	233	235	237	247	249	251	280	298	315	316	326	328	344	352	361	387	393	397	402	409	412	414	423	427	429	430	431	433	438	439	440	442	447	451				
<i>EU627186Badajoz, SPA/18.04</i>	C	A	C	T	A	A	A	G	T	G	G	A	G	C	G	G	G	G	A	A	C	G	C	G	G	G	A	G	G	G	C	G	G	G	A	G	A	A	A	T	G	G	T	A	A	T	A	G	G	T	G			
<i>EU557196Guangdong, PRC/9.04/1</i>
<i>DQ390234Ulanbataar, MONG/50.02</i>	
<i>DQ398076/MGL/26.02</i>	
<i>EU557203Liaoning, PRC/11.04/1</i>	
<i>EU557205Liaoning, PRC/18.04/1</i>	
<i>EU557231Tianjin, PRC/11.04/1</i>	
<i>AY737400TWN/22.92/2</i>	G	
<i>AY737422Pingtung, TWN/33.02</i>	G	
<i>AY738085Taoyuan, TWN/20.03</i>	G	
<i>DQ888763New York, USA/29.06</i>	G	
<i>EU557209Chongqing, PRC/20.04/1</i>	G
<i>EU557230Sichuan, PCR/28.04/1</i>	G	
<i>AY920713Moscow, RUS/13.00/2</i>	G	
<i>DQ902848Shanghai, PRC/11.06/2</i>	G	
<i>DQ902859Shanghai, PRC/20.06/13</i>	.	.	.	C	G	
<i>EU139109Michigan, USA/38.06H1</i>	C	G	
<i>EU557216Shanghai, PCR/36.04/1</i>	G	
<i>EU557227Sichuan, PCR/43.04/5</i>	G	
<i>DQ011612Zhejiang, CHN/9.05/7</i>	A	
<i>EU597258Vladivostok, RUS/22.07</i>	G	G	
<i>DQ011613Zhejiang, CHN/9.05/10</i>	C	
<i>F1157341Jiangxi, CHN/21.07/4</i>	C	G		
<i>F1157342Jiangxi, CHN/21.07/8</i>	G	
<i>AY737421Taipei, TWN/27.02</i>	.	C	T	.	C	C	C	T	.	C	.	.	.	G	C	G		
<i>AY737397TWN/18.92/1</i>	A	.	A	A	A	A	A	A	A	.	G	.	A	.	A	.	A	.	A	A	.	A	T	.	A	T	

Tabla 37. Sustituciones nucleotídicas entre la secuencia H1 de Badajoz y otras secuencias próximas detectadas en otros países. El número de nucleótido está referido al fragmento del extremo 3' del gen N, de 456 nucleótidos.

19. ANÁLISIS DE VARIABILIDAD MOLECULAR EN EL CONTEXTO DE BROTES.

Dentro del brote de Almería del año 2003, solamente cuatro secuencias de la misma provincia y tres de la de Murcia presentaron alguna variación nucleotídica (Tabla 15), y solo tres secuencias presentaron variación en la composición de aminoácidos: L473P en la secuencia GQ228454 MVs/Almería.ESP/6.03, T512K en GQ228456 MVs/Almería.ESP/12.03 y Q499K en GQ228457 MVs/Almería.ESP/13.03. Se trata de un brote limitado en el tiempo, desde enero a julio del 2003. Los tres residuos aminoacídicos mutados se sitúan en la región de unión al factor regulador de interferón 3 (IRF-3) [172, 173], forman también parte de uno de los lugares de reconocimiento de N-TAIL por parte de linfocitos B (419-525) y de linfocitos T-*helper* o colaboradores (457-525) [174, 175]

La variabilidad entre secuencias encontradas en el brote de Madrid de genotipo B3 es menor. De las 82 secuencias analizadas solo dos presentan una única mutación que afecta a la composición de aminoácidos con respecto a la secuencia mayoritaria (Tabla 16): G385S en la secuencia GQ228459 MVs/Madrid.ESP/9.06/1 y G448R en GQ228460 MVs/Madrid.ESP/9.06/2. Este brote se extendió desde enero a julio del año 2006. La posición 448 está incluida en una zona de la proteína N que forma parte de diversos epítomos para linfocitos B [175].

El brote de Barcelona del año 2006 que implicó al genotipo D4 presentó variación de aminoácidos en una sola secuencia de 119 analizadas (Tabla 24): S457G en GQ228458 MVs/Barcelona.ESP/50.06/2. Este brote comenzó en octubre de 2006 y finalizó en junio de 2007. La posición 457 está incluida asimismo en zonas de unión a linfocitos B, linfocitos T-*helper* y a IRF-3 [172-175]. Mientras que el brote de genotipo D4 de Cádiz ocurrido entre febrero y mediados de julio de 2008 presenta variación de aminoácidos en 4 grupos de secuencias con respecto a la mayoritaria (Tabla 27): G422C en dos secuencias representadas por GQ228451 MVs/Cádiz.ESP/11.08, I504V en la secuencia FJ911611 MVs/Cádiz.SPA/14.08/1, A478T en dos secuencias representadas por FJ911612 MVs/Cádiz.SPA/14.08/2 y E426G en otras dos secuencias representadas por GQ228452 MVs/Cádiz.ESP/29.08. Los residuos mutados también están implicados en la unión de la proteína N a linfocitos B y a IRF-3, pero además los aminoácidos de las posiciones 504 y 478 están situados en la zona de N-TAIL que se une a linfocitos T-*helper* [172-175].

Ninguna de las mutaciones encontradas en los brotes descritos aquí se fijó con el tiempo, todas desaparecieron y no se encontraron en las últimas semanas del brote, con la excepción de las tres secuencias procedentes de virus que circularon en Málaga que presentaban una mutación sinónima y se detectaron después del fin del brote de D4 en Cádiz-Ceuta del año 2008. Cabe preguntarse si estas tres secuencias pertenecen realmente al brote o responden a una reintroducción distinta, quizás desde el mismo origen. Para comprobarlo sería necesario secuenciar otras zonas del genoma y compararlas. Por esta razón, estas secuencias han sido excluidas para el cálculo de variabilidad de la Tabla 38.

Los valores obtenidos en los brotes de Madrid 2006 y Barcelona 2007 están en un rango similar al calculado por Kühne y colaboradores [176] para un fragmento de 543 nt del gen N en un brote debido al genotipo D5, mientras que los brotes de Almería 2003 y Cádiz 2008 presentan un valor de variabilidad mayor que en ninguna de las publicaciones encontradas.

<i>Brote</i>	<i>Año</i>	<i>Genotipo</i>	<i>Nº Casos</i>		<i>% secuenciado</i>	<i>Días^a</i>	<i>Mut^b</i>	<i>Variabilidad^c</i>
			<i>Total</i>	<i>Secuenciados</i>				
Almería	2003	B3	190	82	43,1	169	6	$2,8 \times 10^{-2}$
Madrid	2006	B3	174	80	45,9	217	2	$7,3 \times 10^{-3}$
Barcelona	2007	D4	381	124	32,5	273	3	$8,8 \times 10^{-3}$
Cádiz	2008	D4	248	74	29,8	245	4	$1,3 \times 10^{-2}$

a. Días de duración del brote. b. Número de mutaciones. c. Variaciones/posición/año.

Tabla 38. Variaciones encontradas en brotes de más de cien casos en relación a la posición nucleotídica y al ciclo de replicación. Los cálculos de la variabilidad han sido: número de mutaciones encontradas en un brote dividido por el número de nucleótidos analizados (456) y posteriormente la cantidad obtenida se dividió por la duración del brote (número de días de duración del brote/365).

DISCUSIÓN

En este trabajo se han desarrollado las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos necesarias para el diagnóstico y la caracterización del MeV requeridas para adecuar el nivel de sensibilidad del sistema de vigilancia epidemiológica a las exigencias del Plan Nacional de Eliminación de Sarampión que se instauró en España siguiendo las recomendaciones de la OMS. Dichas técnicas se han evaluado de forma comparativa a las de referencia para diagnóstico de sarampión (aislamiento en cultivos celulares y detección de IgM específica), no sólo con muestras retrospectivas procedentes de la colección del ISCIII sino también prospectivas procedentes de todos los laboratorios regionales situados en las distintas CCAA. Los resultados obtenidos avalan su utilidad para el diagnóstico de sarampión como complemento a las de referencia. Además, se ha podido caracterizar el genotipo del MeV en casos de sarampión detectados entre el año 2001 y el 2008, para obtener una visión muy completa de la situación de esta enfermedad exantemática en España en una etapa próxima a la eliminación de la misma. A fin de facilitar este tipo de estudios en condiciones desfavorables, como las que pueden darse con frecuencia en los países de mayor prevalencia de sarampión, se ha estudiado la utilidad de muestras de fácil extracción y transporte, como la sangre seca en papel de filtro o el exudado faríngeo en tampón de lisis, con excelentes resultados.

Finalmente, se ha completado el estudio tratando de establecer cuales son los agentes etiológicos mas importantes de los exantemas infantiles una vez que la prevalencia del sarampión y la rubéola ha caído a niveles compatibles con su eliminación.

Desarrollo y evaluación de una técnica de PCR múltiple para virus del sarampión, virus de la rubéola y parvovirus B19.

La técnica desarrollada para este estudio es la única publicada capaz de detectar los tres virus productores de enfermedad exantemática "a priori" más importantes, haciendo posible el diagnóstico diferencial en una sola prueba. Dicha PCR de virus exantemáticos múltiple y anidada ha demostrado una sensibilidad absoluta muy alta para la detección de los tres virus en experimentos con diluciones de plásmidos de cDNA y una sensibilidad relativa muy superior a la del aislamiento del virus en cultivos celulares para MeV y RUBV, todo ello manteniendo una elevada

especificidad. Ambas características son críticas para el uso de la técnica en diagnóstico clínico; puesto que la sensibilidad es fundamental en determinadas muestras que normalmente contienen pequeñas cantidades de virus, como es el caso del suero, LCR o líquido amniótico, y aumenta la duración de la ventana diagnóstica para el exudado faríngeo y la orina, mientras que la especificidad garantiza la ausencia de resultados falsos positivos por reacciones de amplificación cruzadas con virus de características similares.

La alta sensibilidad mostrada en los experimentos realizados en este trabajo correlaciona con los resultados obtenidos en muestras de exudados faríngeos y orinas de un caso de rubéola congénita y muestras de suero de un brote de eritema infeccioso (Tabla 8) [135], al igual que con las muestras del brote de sarampión de Almería 2003 (Figura 20) [94]. Todos estos resultados concuerdan, a su vez, con estudios previos [177-192]. Sin embargo, la proporción de detección de virus en sueros de archivo de casos de RUBV y MeV, al igual que en LCR de enfermedades neurológicas relacionadas con MeV (Tabla 8) también de archivo, resultó menor de la esperada comparado con datos previos publicados [185, 193, 194]. En el caso de los sueros probablemente se debió a la degradación del ARN debido a condiciones subóptimas de almacenamiento, con un número indeterminado de congelaciones y descongelaciones en las muestras procedentes de la colección del ISCIII. Por otro lado, podría tratarse de que la amplificación del ARN de MeV en muestras de suero es infrecuente, especialmente después de la primera semana del inicio de los síntomas [195].

Por estas razones se realizó una evaluación adicional de la eficacia diagnóstica, comparando la PCR múltiple con la detección de IgM en muestras recientes y adecuadamente conservadas del brote de sarampión ocurrido en Almería en el año 2003 en la que un 63,6% (105 sueros positivos de 165 casos) de los sueros fueron positivos, en claro contraste con el nulo rendimiento de muestras archivadas en condiciones inadecuadas para la conservación de ARN. Habitualmente, el diagnóstico de MeV se basa en la detección de IgM específica por técnicas de ELISA, IFI o HAI. Sin embargo, los resultados encontrados demuestran que la detección de ARN con PCR múltiple anidada usando muestras de orina y exudado faríngeo proporciona un marcador más sensible. Esto podría deberse, en nuestro caso, a que la recogida de muestras se produjo en los primeros momentos de la infección en el contexto de

este brote. La mayoría de muestras en este estudio se tomaron en los días 1 al 3 (115 exudados faríngeos y 114 sueros) después del inicio del exantema y mostraron una proporción mayor de casos con detección de ARN en exudados faríngeos (72,2%) que de detección de IgM específica en suero (65,8%). En algunas publicaciones se afirma que los anticuerpos IgM en suero muestran su nivel más alto a los dos días del comienzo del rash [196], mientras que en otro estudio se describe que la proporción de detección de ARN en exudados faríngeos (98%) es mayor que la de IgM específica de MeV (83%) durante los tres primeros días después del comienzo [34], en concordancia con nuestros resultados. El uso de las pruebas de detección directa como esta también permite el diagnóstico de casos de sarampión con IgM negativa e IgG positiva, tanto en pacientes con inmunidad natural que sufren reinfecciones como cuando se producen falsos negativos de la técnica de ELISA.

Como ya se ha dicho, una proporción del 63,6% de los sueros fueron positivos por PCR, en contraste con otro artículo que muestra una amplificación de solo un 24% de casos [195]. De nuevo, la recogida temprana de muestras puede ser la causa de esta diferencia. Aunque la PCR realizada en exudados faríngeos y orina proporciona un marcador diagnóstico más sensible, la amplificación del genoma directamente en suero debe intentarse en ausencia de estas muestras si se quiere caracterizar el genotipo del virus. En el brote de Almería del 2003, esto hizo posible trazar el caso índice y caracterizar el origen geográfico del brote a partir de una muestra archivada en el hospital donde se trató al paciente.

Aunque la PCR es más sensible que el aislamiento en cultivos celulares, este último proporciona virus vivo permitiendo una caracterización más profunda del fenotipo de las cepas implicadas en los brotes. Obviamente, los virus aislados pueden proporcionar una información adicional sobre propiedades biológicas y antigénicas de la cepa que son de gran interés epidemiológico y no pueden obtenerse de la secuencia [197-200]. Por dicha razón, el aislamiento vírico debe intentarse siempre.

Otra ventaja del método de PCR diseñado es la monitorización de las condiciones de reacción en cada tubo individual a través de la inclusión del plásmido diana del control interno en el tampón de lisis, de forma que deba pasar por todo el proceso analítico, permitiendo, no solo la detección de inhibidores inespecíficos de la amplificación, sino también de errores de manipulación o cualquier otro problema

que se presente durante todo el proceso. Por otro lado, el uso de un número limitado de moléculas de plásmido hace posible monitorizar la presencia de cualquier factor que afecte mínimamente a la sensibilidad de la reacción en cada tubo individual. En consecuencia, la posibilidad de falsos negativos se reduce significativamente al usar este sistema y no compromete por sí mismo ni la sensibilidad ni la especificidad [134, 201, 202].

La técnica de PCR de exantemáticos está siendo de gran utilidad en la monitorización del grado de progreso en la eliminación del sarampión, ya que en el momento actual en que la vigilancia y el control se plantea sobre cada caso individual, permite asegurar que se obtiene un diagnóstico en aquellos casos en los que la recogida de muestras es excesivamente temprana, lo cual no sería posible solo con la IgM como demuestran nuestros resultados. Hay que considerar, por otro lado, que no siempre es posible obtener muestras en un plazo de tiempo adecuado para la detección de IgM mediante una segunda extracción de muestras a los pacientes. El aislamiento en cultivo no solo es menos sensible que la PCR, sino que, además, es una técnica lenta que retrasa considerablemente la emisión de resultados restándoles utilidad a la hora de disparar los mecanismos de control previstos en los protocolos de eliminación en el entorno de cada caso positivo, tras su diagnóstico. Por ello, cada vez se acepta con más frecuencia un positivo a sarampión por RT-PCR como criterio de confirmación de caso de sarampión en ausencia de muestra de suero. Aunque, es necesario resaltar que la técnica de referencia sigue siendo la detección de IgM específica en suero, y que cualquier resultado obtenido únicamente por PCR debería confirmarse en un suero de fase aguda o convaleciente cuando sea posible. Por otra parte, según los protocolos actuales, un resultado negativo por PCR en ausencia de determinación de IgM no permite descartar el caso como negativo.

PCR, genotipificado y detección de IgM en sangre seca en papel de filtro y exudado faríngeo en tampón de lisis.

Las muestras de sangre seca en papel de filtro han permitido realizar el diagnóstico de dos brotes de sarampión en Guinea Ecuatorial en condiciones de muestreo y transporte precarias, tanto por detección de IgM como por detección de genomas por PCR, permitiendo, además la caracterización del genotipo del virus.

En lo referente a los resultados serológicos, es destacable que el ensayo de ELISA de captura de cadenas pesadas para detección de IgM específica de MeV [145, 203] presentó una alta sensibilidad en el estudio del brote de Guinea Ecuatorial del 2001, ya que permitió detectar resultados positivos en muestras tempranas. Sin embargo, con esta técnica se han detectado, en otros estudios, algunos problemas de especificidad debido a resultados falsos positivos en casos de infección debida a otras enfermedades exantemáticas, como rubéola, eritema infeccioso o dengue [145]. Esta podría ser la causa del resultado positivo obtenido por el ensayo de captura en la muestra que también presentaba PCR positiva a parvovirus B19.

Por otro lado, a pesar de que se ha publicado que el ELISA indirecto es una técnica tan sensible y específica para suero [145, 203] como para muestras de sangre seca [15, 146], en nuestro estudio mostró una sensibilidad escasa. Los altos valores de densidad óptica obtenidos en el pocillo de control de antígeno, que causaron muchos de los resultados no valorables o negativos en casos positivos por PCR de exantemáticos, podrían indicar la presencia de residuos sanguíneos en la dilución que interferirían en la técnica. El uso de procedimientos de dilución alternativos como los mostrados en el artículo de Riddell et al [146] podría evitar este problema, pero este estudio no estaba disponible en el momento del procesamiento de las muestras. Los resultados serológicos obtenidos en el año 2008 fueron mucho mejores y todas las muestras, excepto una, resultaron positivas, pasando el rendimiento obtenido con el ELISA indirecto de un 57% a un 95,6%. Sin embargo, los resultados de PCR fueron peores cambiando el rendimiento de un 40% en 2001 a un 13% en 2008. Estas diferencias podrían deberse a una recogida de la muestra más cercana a la fase aguda en las muestras recogidas en el año 2001 que en las recogidas en 2008 o a diferencias en las condiciones de almacenamiento entre ambos grupos de muestras, aunque no tenemos constancia de ello. Sin embargo, estos resultados sí que muestran claramente que la detección de genomas por PCR y la detección de IgM son técnicas complementarias para el diagnóstico en este tipo de muestras al igual que en suero. Finalmente, el rendimiento de la PCR en exudados faríngeos tomados en tampón de lisis resultó excelente, permitiendo diagnosticar la totalidad de los casos de 2008 y realizar la caracterización del genotipo siempre que se intentó. A la vista de estos resultados, la estrategia que parece más recomendable para caracterizar brotes de sarampión con máxima eficacia en condiciones de campo

donde no es posible realizar punción venosa ni asegurar el mantenimiento de la cadena del frío es tomar exudado faríngeo en tampón de lisis para diagnóstico directo y muestra de sangre seca en papel de filtro para serología. Sin embargo, cualquiera de las dos muestras por si misma hubiese permitido llegar a la identificación del agente causante del brote utilizando la técnica de PCR o la detección de IgM específica.

Estudio de los exantemas víricos infantiles en el contexto de una alta cobertura de vacunación con triple vírica.

Los principales agentes etiológicos productores de exantema en niños en la Comunidad de Madrid son el virus HHV-6 y EV, seguidos por HHV-4 y AdV. La presentación de casos de exantema producidos por HHV-6 se ha detectado, como se esperaba, sobre todo en niños menores de 3 años ya que el exantema súbito es una enfermedad típica de los primeros meses de vida [204-206]. Aunque las tasas de incidencia más elevadas se alcanzan durante los tres primeros meses, las infecciones por enterovirus pueden producirse a cualquier edad [112]. En este estudio las infecciones por enterovirus fueron más frecuentes en el grupo de entre 15 meses y menos de 3 años. Llama la atención la escasa aportación de parvovirus B19, agente típico productor de exantemas infantiles. Esto podría ser debido a que el estudio haya coincidido con una circulación escasa de este virus, ya que este agente se caracteriza por producir picos epidémicos cada cierto número de años [95, 97, 103]. Finalmente, hay que tener en cuenta que 26 (29,5%) de los pacientes fueron negativos pese a la completa batería de agentes considerados [204].

El sarampión y la rubéola son enfermedades sometidas a planes de vacunación sistemática. En España la cobertura de vacunación es muy alta, por encima del 95% [207, 208] por lo que la mayoría de exantemas en la infancia aparecen en niños vacunados con la vacuna triple vírica. Por esta razón, son otros los virus causantes de la mayoría de los casos, aunque en algunas ocasiones estos exantemas podrían ser casos de sarampión o rubéola atenuados o leves que no cumplen los criterios de definición de caso de los planes de vigilancia. En el transcurso del estudio pudieron detectarse dos de estos casos de sarampión. En uno de los dos el carácter postvacunal pudo ser confirmado mediante el estudio de la secuencia del virus, el

otro, aunque no se pudo genotipificar, tenía antecedente de vacunación 6 días antes de la aparición de los síntomas. Ambos escaparon al sistema de vigilancia al no cumplir los criterios clínicos de inclusión de caso. El único caso que cumplió los criterios de infección por virus de la rubéola se presentó como una infección doble 34 días después de haberse vacunado al paciente con SRP, con lo cual la IgM detectada se debe a residuos de anticuerpo provocados por la vacunación y es más razonable atribuir el exantema al HHV-6. En cualquier caso, es de destacar que en el transcurso del estudio no se han detectado casos de sarampión por cepas salvajes que hayan escapado a la definición de caso del Plan nacional de Eliminación, aunque el estudio se realizó en un período en el que no existía ninguna situación de brote en el área geográfica del estudio.

Es muy destacable el número de infecciones múltiples diagnosticadas, lo cual puede ser debido a que en los primeros años de la vida se suceden infecciones con mucha frecuencia, solapándose, probablemente, los períodos en los que son detectables los anticuerpos de clase IgM específicos de cada virus, tal y como ha ocurrido con el caso comentado anteriormente en el que la IgM inducida por la vacuna de la rubéola solapaba con la de HHV-6. Estas infecciones múltiples hacen difícil la interpretación de los resultados. Por un lado, la frecuencia de estas infecciones disminuye considerablemente con la edad, siendo alta en niños de 0 a 3 años en esta serie y, bajando mucho el número de casos después de los tres años, excepto en el caso de EV, en que ocurre lo contrario. Los anticuerpos IgM o IgG de baja avididad de infecciones pasadas en niños menores de 3 años podrían ser todavía detectables en el momento de la infección exantemática por un nuevo agente, solapándose la presencia de marcadores diagnósticos de infección reciente para ambos y dando como resultado una infección simultánea ficticia. Por otro lado, algunos resultados serológicos dobles por herpesvirus podrían reflejar también reacciones cruzadas. Además, en algunos casos puede ocurrir que un herpesvirus se reactive debido a la enfermedad causada por otro agente causante del exantema siendo sus genomas detectables por PCR. Finalmente, es posible que varios virus puedan haber sido transmitidos simultáneamente si comparten la misma ruta de transmisión, dando infecciones múltiples reales.

Debido al hecho de que algunos herpesvirus encontrados más frecuentemente, como HHV-6 y HHV-4, han sido implicados en muchas infecciones dobles (30,8% para

HHV-6 y 40,0% para HHV-4) podrían estar sobreestimados como causa de exantema [209-211].

Otros virus como EV y AdV detectados también con frecuencia en infecciones dobles, 40,0 y 14,3% respectivamente, son virus ubicuos y su presencia puede no reflejar necesariamente la causa del exantema, por mucho que, al ser detectados por PCR sea seguro que estaban presentes en el momento de los síntomas.

En este estudio hubiera sido necesario incluir un grupo control de niños sanos para poder valorar las prevalencias de anticuerpos IgM y de presencia asintomática de genomas, sin embargo, esto no fue factible debido al rechazo que produce en los padres y en los pediatras extraer sangre en niños sanos de tan corta edad. La ausencia de este grupo puede haber sido causa de sobreestimación del papel de algunos virus en la etiología de los exantemas infantiles. Por otra parte, tanto parvovirus B19, como algunos tipos de adenovirus y enterovirus circulan de forma epidémica, por lo que una valoración adecuada de su importancia como agentes causales de exantema precisaría de un estudio más prolongado en el tiempo.

Estudio de los patrones generales de circulación de genotipos de virus del sarampión en España entre los años 2001 y 2008.

La caracterización del genotipo del MeV es considerada en los protocolos de vigilancia epidemiológica de los planes de eliminación como un componente esencial, ya que ayuda a distinguir entre transmisión endémica e importación del virus cuando se dispone de suficientes casos y de una perspectiva temporal adecuada, siendo un indicador relevante del estadio de eliminación [10, 25, 26]. Además, puede permitir establecer relaciones entre casos que ocurren simultáneamente en diferentes localidades o países y confirmar los datos epidemiológicos en cuanto a la fuente de importación o sugerirlas en ausencia de estos, todo lo cual es de la máxima relevancia para el estudio y el manejo de brotes individuales [43, 212]. Finalmente, permite confirmar casos postvacunales [213]. Por todo ello, la OMS ha normalizado los métodos de genotipificado indicando cual es la región del genoma donde debe trabajarse y las cepas de referencia de cada uno de los genotipos [21]. Para la designación de genotipos nuevos es necesario, además, la secuencia del gen completo de la hemaglutinina (H) [22]. En el transcurso del trabajo actual, no se ha

detectado ninguna secuencia no tipificable, con lo que ha bastado la secuencia parcial de la nucleoproteína para resolver todos los casos asignándolos a un genotipo determinado. La elección del fragmento genómico utilizado en este trabajo ha seguido el criterio internacional al ser la única manera de poder poner nuestros resultados en un contexto global. Sin embargo, cuando se observa el gráfico de variabilidad del genoma del MeV (Figura 23), se puede apreciar que hay otras zonas que concentran igual o mayor variabilidad, por ejemplo el gen de la fosfoproteína [214].

La variedad de genotipos encontrada en nuestro país en estos años refleja la situación de la circulación vírica en los países de nuestro entorno en cada momento [27, 28, 31, 41, 43, 44, 63, 153, 154, 159, 165, 215-221]. Hasta 1997 los datos de genotipos encontrados en España mostraron una clara prevalencia de uno de ellos, con reemplazamiento posterior por otro. Está descrito en la bibliografía que en el otoño de 1994 en el área geográfica de Madrid se produjo un cambio de genotipo desde el C2 circulante hasta ese momento en España y otros países de Europa, al genotipo D6, que circuló en España hasta 1997 [163, 164]. Sin embargo, tanto la secuencia de genotipo C2 del año 1993 (X84871 Madrid.ESP/93/2, Figura 41), como la de D6 del año 1994 (X84863 Madrid.ESP/94/1, Figura 45) difieren mucho de las secuencias C2 y D6 encontradas en el período de este estudio demostrando la interrupción de la circulación de estas cepas endémicas. Este patrón de un solo genotipo circulante es típico de áreas endémicas con un alto número de casos de sarampión por año, debido a baja cobertura vacunal [149, 222-225], como ocurría en España entre los años 1970 y 1997 [163]. La vigilancia seroepidemiológica llevada a cabo en 1996 mostró que la cobertura vacunal en España se encontraba por encima del nivel recomendado por la OMS para prevenir la circulación del virus en la mayoría de grupos de edad [64]. Por ello, el patrón general encontrado en el período 2001-2008 objeto de esta tesis, que se ha caracterizado por la combinación de diferentes genotipos (Figura 35 y Figura 36), sugiere que ya no hay una circulación continua de MeV autóctono, sino que ha habido numerosos episodios de importación diferentes desde áreas que en muchos casos pueden establecerse claramente. Este patrón es consistente con el bajo número de casos de sarampión detectados durante estos años y con la observación de diversos períodos de tiempo de duración superior al período de incubación de la enfermedad [81, 226], hechos que también apoyan la

hipótesis de la carencia de circulación autóctona y de situación próxima a la eliminación de la enfermedad [168, 219, 227]. Aunque, como se ha comprobado, la existencia de bolsas locales de adultos susceptibles y el hecho de que los niños menores de 15 meses no estén vacunados continuará permitiendo la aparición de casos, e incluso de brotes autolimitados hasta que la eliminación se amplíe al resto del mundo.

Durante el período de estudio se han producido, tanto casos esporádicos o pequeñas agrupaciones de casos causados por diversos genotipos, como brotes de varios cientos de casos como el de genotipo B3 de Almería del año 2003 [94] con origen en el norte de África (190 casos), o como el de Madrid , también por B3, del año 2006 (174 casos) [160] y el de Barcelona de D4 en 2006-2007 (381 casos) [166] cuyo origen se encontró en países europeos, Reino Unido e Italia respectivamente, donde también produjeron brotes con un número considerable de casos [152-154] o, finalmente, el brote de Cádiz-Ceuta del 2008 (239 casos) [167] producido por una cepa D4 diferente cuyo origen es desconocido.

Los orígenes de importación de casos de sarampión han sido, pues, diversos, aunque por encima de todos destaca Europa. Entre los años 2001 y 2003 se registraron con frecuencia casos aislados y brotes por genotipo D7. El primero que se detectó en este estudio fue el de Ibiza en 2001, con origen desconocido y afectando a 8 casos [80]. Es preciso mencionar que dicho genotipo se encontró en varios países europeos en ese mismo año [27, 35, 37, 228]. El brote de Valencia del mismo genotipo del año 2002 afectó solo a 15 casos y tenía origen epidemiológico en Rumania [229]. Finalmente, en el año 2003 se produjo otro de D7 con 15 casos en Alcalá de Henares (Comunidad de Madrid) de origen desconocido. Sin embargo, este genotipo desaparece y a partir del año 2005 los casos importados desde el Este de Europa pertenecen al genotipo D4, excepto en el año 2006 donde predominaron las importaciones por genotipo D6 coincidiendo con un brote de varias decenas de miles de casos en Ucrania [230]. Contrasta la ausencia de casos importados de genotipo D6 en fechas posteriores a ese año con la aparición de brotes de genotipo D4, como por ejemplo, el ocurrido en Barcelona en 2006-2007 con origen en Italia [166] o el de Cádiz de 2008 de origen desconocido [167]. Finalmente, también destacó el Reino Unido como fuente de importación de casos de genotipo B3 en 2006 causando en ocasiones brotes de tamaño importante como el de Madrid [160].

El norte de África ha sido fuente de importación de casos por genotipo C2 entre los años 2002 y 2004, coincidiendo con la circulación de este genotipo en Marruecos [156, 165], que parece haberse interrumpido, ya que no ha vuelto a ser detectado con posterioridad. En uno de ellos del año 2003 con tres personas afectadas y en otros casos esporádicos del mismo año, el origen marroquí tuvo el respaldo de los datos epidemiológicos, siendo la secuencia de estas cepas exactamente igual a las de origen desconocido de los años 2002 y 2004. Además, dos cepas de genotipo D8 de origen desconocido importadas en los años 2003 en la Comunidad Valenciana (nueve casos) y 2005 en Granada, son similares a otras detectadas en Marruecos en esos mismos años sugiriendo que éste pueda ser su origen [156, 159, 165]. Finalmente una cepa D4 muy diferente a las europeas pero similar a una marroquí del año 2008 (Tabla 26) fue causante de un brote cuyo origen estuvo en un ferry que presta servicio entre Ceuta y Algeciras, aunque, tanto en este caso como en el de las de genotipo D8 de 2003 (Alicante) y 2005 (Granada), hay descritas otras cepas iguales de origen europeo, Suiza en el caso de D8 y Gran Bretaña y Alemania en el de D4, con lo que no puede atribuirse con seguridad su origen a Marruecos (Tabla 33). En cualquier caso, Marruecos no parece ser una fuente tan frecuente de importación como cabría esperar habida cuenta de los intensos movimientos de población que se producen entre este país y España. En el año 2003 se produjo un brote importante por genotipo B3 en Almería importado desde Argelia, aunque no se han vuelto a detectar cepas similares desde entonces [36]. Otras cepas diferentes de este mismo genotipo, sin embargo, sí que han sido importadas desde el oeste de África, más concretamente desde Guinea Ecuatorial en el año 2001 [36] y probablemente desde este mismo país u otro de la misma área en el año 2008, en ambas ocasiones en Madrid [81]. En ambos casos dio la casualidad de que pudieron estudiarse cepas guineanas circulantes en ese mismo momento resultando idénticas. Finalmente, de forma mucho más esporádica se han producido importaciones desde el continente asiático, en dos ocasiones de genotipo H1 procedente de niñas adoptadas en China y en una ocasión de genotipo D5 de origen tailandés. Otros casos de genotipo D5 Y D9, podrían tener origen asiático, pero no se dispone de certeza epidemiológica. Las fuentes de importación detectadas durante el período de estudio, reflejan pues los movimientos de población y nuestros lazos de unión de tipo cultural y geográfico. Asimismo, muestran el enorme beneficio que supone para España el avanzado

estado de eliminación del sarampión en Latinoamérica, región con la que mantenemos una intensa relación cultural y fuertes intercambios de población y que en otras circunstancias sería esperable que fuese una fuente importante de casos importados. Muy al contrario, en el transcurso del estudio sí que se ha podido filiar un episodio de exportación de una cepa de genotipo B3 desde España a Venezuela [161].

En España no se ha detectado en ningún momento de este estudio cocirculación de dos genotipos de MeV en un mismo brote como ha ocurrido en Grecia con los genotipos D6 y D4 [231]. Tampoco se ha encontrado un brote de larga duración (8 meses) que en realidad, gracias a la genotipificación, se comprobó que correspondía a varios brotes y casos esporádicos como ocurrió en Dinamarca en 2006 [232]. Sí se han hallado casos esporádicos de genotipos diferentes al causante del brote, como por ejemplo, un caso esporádico de H1 (Nº acceso GenBank: AY521176) durante el brote de D7 del 2001 en Mallorca, un caso de C2 durante el brote de B3 de Almería 2003 (Nº acceso GenBank: EU627190) [36] o uno de D6 en el brote de B3 de Madrid 2006 (Nº acceso GenBank: EU086726) [43]. Además, se han podido filiar varios casos post-vacunales en el contexto de brotes por cepas salvajes, como por ejemplo las secuencias con número de acceso de GenBank AY521178, AY522906, AY522904, GQ374249 en Almería 2003; FJ911607 y FJ911608 en Soria 2007 (D4); AY522903 en Ibiza 2001 (D7); GQ374247, EU086727 y GQ374248 en Madrid 2006 (B3) (Figura 39 y Tabla 13). En todos los casos de genotipo A la secuencia detectada era igual al componente de sarampión de la vacuna SRP utilizada en España (Tabla 13).

El estudio de las cepas importadas en España durante estos años, permite también establecer hipótesis acerca de la circulación en los países de origen de dichas cepas. Así, en Europa oriental parece haberse producido un cambio de cepa predominante de D7 en 2001-2003 a D4 entre 2005 y 2007, habiendo irrumpido de forma súbita y explosiva, pero fugaz, el genotipo D6 en 2006, que no parece haber establecido circulación, todo lo cual coincide con los datos bibliográficos [43]. De la misma forma, la cepa de genotipo B3 que produjo un gran brote en Guinea Ecuatorial y países del entorno en 2008, es diferente de la que produjo brotes en esa misma región en 2001, sin que pueda establecerse si dichas diferencias se deben a evolución por circulación sostenida o a la irrupción de una nueva cepa importada desde otra región. Finalmente, no parece observarse la circulación continuada de

ningún genotipo en Marruecos a partir del año 2004, tal y como se recoge en la literatura [159].

Los datos provenientes de este estudio, nos muestran que, siendo los genotipos una herramienta de gran utilidad, es necesario afinar la discriminación un poco más allá si se quiere tener una idea exacta de la circulación del virus. Son buenos ejemplos los genotipos B3 y D4 en los que pueden distinguirse cepas de diferente origen que, en ocasiones, incluso han llegado a ser detectadas durante el mismo año, como ocurrió en el año 2006 cuando se produjo un caso en Málaga por una cepa de genotipo B3, similar a otras que en ese momento circulaban en Suecia y Dinamarca, en el contexto de brotes localizados en Madrid o Las Palmas importados desde el Reino Unido causados por otra cepa B3 diferente (Tabla 17 y Tabla 18). Asimismo, el árbol filogenético permite observar la ausencia de relación epidemiológica entre estas dos cepas y la que produjo un brote importado desde Argelia en 2003 o las que produjeron brotes importados desde el África subsahariana en 2001 y 2008 (Figura 40). De la misma forma, las cepas D4 causantes de brotes en 2008 son muy diferentes de las de origen europeo del periodo 2005-2007, con las que no puede establecerse una relación epidemiológica (Figura 43). En todos estos casos, un análisis basado meramente en el genotipo, sin ir más allá, podría haber conducido a conclusiones equivocadas.

Finalmente, resulta destacable que durante el brote de MeV de Cádiz-Ceuta los resultados de laboratorio permitieron detectar un brote de rubéola concomitante, que habría pasado inadvertido con un diagnóstico meramente clínico de los casos [91], demostrando, en general, la importancia del laboratorio en la vigilancia epidemiológica de los exantemas víricos vacunables y en particular el papel de las técnicas múltiples de detección de genomas.

En el caso de los brotes de Madrid y Barcelona, el rango de variabilidad observado, está en el mismo orden de magnitud que en el brote de la única publicación [176] en la que éste se calcula por una metodología similar. En dicha publicación, los autores obtuvieron un rango de sustitución por año y por posición de $4,4 \times 10^{-3}$, en el mismo orden de lo obtenido en este estudio. Sin embargo, el número de mutaciones fue muy superior a lo esperado en los brotes de Almería y Cádiz. Estas diferencias no pueden ser atribuibles ni al genotipo implicado, ni al porcentaje de casos genotificados, ni al propio tamaño de los brotes, a la vista de los datos de la Tabla

38. La aparición de un número de mutaciones superior al esperado, de acuerdo a la duración del brote, en Almería y Cádiz, podría explicarse si el tamaño o la duración de los brotes hubiese sido infraestimada. Para obtener una variabilidad en el rango esperado, la duración hubiera tenido que ser de 600 días en vez de 169 en el caso de Almería o de 500 días en vez de 245 en el de Cádiz. Tales diferencias resultan difíciles de explicar, ya que los respectivos casos índices pudieron ser localizados en ambos brotes. Otra posibilidad es que haya podido haber algún evento de importación adicional durante el transcurso de estos dos brotes desde el mismo lugar geográfico original, donde el brote llevaría evolucionando más tiempo habiéndose generado una mayor variabilidad. En este sentido en el año 2008 se produjeron en Madrid dos episodios concomitantes de importación, uno desde Guinea Ecuatorial (el de San Sebastián de los Reyes del 2008) y otro presumiblemente de la misma área africana (los casos de Alcorcón 2008), en la que se observaban variaciones coincidentes con las que en ese momento circulaban en Guinea Ecuatorial, donde el brote llevaba circulando varios meses de forma masiva. En definitiva, serían necesarios estudios adicionales para poder extraer conclusiones al respecto.

A pesar de que se ha observado la aparición de diversas mutaciones no sinónimas que, en ocasiones, afectan a localizaciones que tienen asignadas funciones, no parece observarse ningún fenómeno de selección positiva ya que ninguna mutación parece imponerse tras su aparición, lo cual está de acuerdo con la estabilidad atribuida al MeV.

CONCLUSIONES

1. La técnica de PCR múltiple diseñada, puesta a punto y evaluada en esta tesis doctoral permite la detección simultánea del MeV, del RUBV y de B19V, mostrándose como una herramienta muy útil para la vigilancia epidemiológica del sarampión, al ser un complemento imprescindible a la detección de IgM específica si se desea alcanzar la máxima eficacia diagnóstica, especialmente cuando las muestras se recogen en momentos muy tempranos. Además, permite realizar de forma simultánea y sin esfuerzo adicional, pero con eficacia, el diagnóstico diferencial frente a rubéola y parvovirus B19 en los casos negativos.
2. En condiciones en las que no es posible practicar punción venosa, ni asegurarse el mantenimiento de la cadena de frío, el exudado faríngeo conservado en tampón de lisis celular y la sangre seca en papel de filtro permiten realizar el diagnóstico de laboratorio de la infección por MeV, tanto por serología como por detección directa de genomas, así como caracterizar el genotipo, constituyendo una buena alternativa a las muestras recomendadas en los manuales de los planes de eliminación.
3. No se han podido detectar casos pediátricos subclínicos de exantema por cepas salvajes de MeV, atendiendo a la definición clínica de caso de la OMS, aunque sí de sarampión postvacunal. En el contexto actual, definido por una alta cobertura de vacunación con la vacuna triple vírica, los principales virus productores de exantema con fiebre en una población pediátrica fueron, por este orden, HHV-6, EV, HHV-4 y AdV.
4. Entre los años 2001 y 2008 se han podido detectar 11 genotipos diferentes del MeV en España (A, B3, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9, C2, H1) sin que se haya observado circulación continua de ninguno de ellos. Este patrón concuerda con los datos de prevalencia de la enfermedad y de coberturas vacunales y sugiere su origen importado y la interrupción de la circulación autóctona del virus. Todos los casos por genotipo A tenían antecedente reciente de vacunación y su secuencia era idéntica a la de la cepa vacunal en uso en el momento del estudio.

5. El origen geográfico de las cepas importadas de MeV está de acuerdo con lo esperable a tenor de los movimientos de población acaecidos en España durante el período de estudio. Se ha detectado un predominio de cepas de origen europeo, especialmente países del Este (D7, D4, D6) y Reino Unido (B3) seguido de otras de origen norteafricano (C2 de Marruecos y B3 de Argelia), subsaharianas (B3 de Guinea Ecuatorial) y de forma mucho más esporádica de países asiáticos (H1 de China y D5 de Tailandia). El origen geográfico de otros genotipos detectados esporádicamente como D3, D8 y D9 es difícil de determinar con precisión. A pesar del fuerte intercambio de población con Latinoamérica, no se han registrado importaciones de este origen, gracias a que el sarampión se considera eliminado en todo el continente americano desde el año 2002.
6. El estudio continuado de los genotipos implicados en episodios de importación ha reflejado los cambios en los genotipos predominantes en el lugar de origen en el caso del Este de Europa, de D7 antes de 2003 a D4 después de 2004 y D6 en 2006, y en el caso de Marruecos, donde la circulación de C2 parece interrumpirse en 2004.
7. El estudio de la variación intragenotípica es aconsejable en el caso de los genotipos encontrados con mayor frecuencia, ya que fue posible detectar la importación de cepas discriminables del mismo genotipo procedentes de áreas geográficas diferentes, tanto en el caso del genotipo B3 (Norte de África, África subsahariana, Reino Unido y Escandinavia), como en el de D4 (Europa del Este y origen desconocido).
8. Aunque en el transcurso de diferentes brotes se han detectado mutaciones no sinónimas que afectan a residuos localizados en regiones de la nucleoproteína que han sido implicadas en funciones biológicas o sitios de reconocimiento antigénico, ninguna de ellas parece haber sido seleccionada positivamente ni haber afectado en nada al transcurso de los brotes.

BIBLIOGRAFÍA

1. **01.048.1.02.001. Measles virus.**
[http://phene.cpmc.columbia.edu/Ictv/fs_param.htm#Genus12]
2. Griffin DE: **Measles virus.** In: *Fields Virology*. Edited by Knipe DM, Howley PM, vol. 2, 5th edn. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins, Wolters Kluwer Health; 2007: 1551-1585.
3. Rima BK, Duprex WP: **Molecular mechanisms of measles virus persistence.** *Virus Res* 2005, **111**(2):132-147.
4. Bourhis JM, Canard B, Longhi S: **Structural disorder within the replicative complex of measles virus: functional implications.** *Virology* 2006, **344**(1):94-110.
5. Bankamp B, Horikami SM, Thompson PD, Huber M, Billeter M, Moyer SA: **Domains of the measles virus N protein required for binding to P protein and self-assembly.** *Virology* 1996, **216**(1):272-277.
6. Naim HY, Ehler E, Billeter MA: **Measles virus matrix protein specifies apical virus release and glycoprotein sorting in epithelial cells.** *Embo J* 2000, **19**(14):3576-3585.
7. Lamb RA, Parks GD: **Paramyxoviridae: The viruses and their replication.** In: *Fields Virology*. Edited by Knipe DM, Howley PM, vol. 1, 5th edn. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins, Wolters Kluwer Health; 2007: 1449-1496.
8. Perry RT, Halsey NA: **The clinical significance of measles: a review.** *J Infect Dis* 2004, **189** Suppl 1:S4-16.
9. Mosquera MM, Echevarria JE, de Ory F: **Sarampión.** In: *Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Edited by Ausina Ruiz V, Moreno Guillen S. Madrid: Editorial Médica Panamericana, S. A.; 2006: 829-833.
10. **New genotype of measles virus and update on global distribution of measles genotypes.** *Wkly Epidemiol Rec* 2005, **80**(40):347-351.
11. Chibo D, Riddell MA, Catton MG, Birch CJ: **Applicability of oral fluid collected onto filter paper for detection and genetic characterization of measles virus strains.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**(7):3145-3149.
12. De Swart RL, Nur Y, Abdallah A, Kruining H, El Mubarak HS, Ibrahim SA, Van Den Hoogen B, Groen J, Osterhaus AD: **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):270-273.
13. El Mubarak HS, Yuksel S, Mustafa OM, Ibrahim SA, Osterhaus AD, de Swart RL: **Surveillance of measles in the Sudan using filter paper blood samples.** *J Med Virol* 2004, **73**(4):624-630.
14. Helfand RF, Kebede S, Mercader S, Gary HE, Jr., Beyene H, Bellini WJ: **The effect of timing of sample collection on the detection of measles-specific IgM in serum and oral fluid samples after primary measles vaccination.** *Epidemiol Infect* 1999, **123**(3):451-455.

15. Helfand RF, Keyserling HL, Williams I, Murray A, Mei J, Moscatiello C, Icenogle J, Bellini WJ: **Comparative detection of measles and rubella IgM and IgG derived from filter paper blood and serum samples.** *J Med Virol* 2001, **65**(4):751-757.
16. Jin L, Vyse A, Brown DW: **The role of RT-PCR assay of oral fluid for diagnosis and surveillance of measles, mumps and rubella.** *Bull World Health Organ* 2002, **80**(1):76-77.
17. Mercader S, Featherstone D, Bellini WJ: **Comparison of available methods to elute serum from dried blood spot samples for measles serology.** *J Virol Methods* 2006, **137**(1):140-149.
18. Samuel D, Sasnauskas K, Jin L, Gedvilaite A, Slibinskas R, Beard S, Zvirbliene A, Oliveira SA, Staniulis J, Cohen B *et al*: **Development of a measles specific IgM ELISA for use with serum and oral fluid samples using recombinant measles nucleoprotein produced in *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Clin Virol* 2003, **28**(2):121-129.
19. el Mubarak HS, Van De Bildt MW, Mustafa OA, Vos HW, Mukhtar MM, Groen J, el Hassan AM, Niesters HG, Ibrahim SA, Zijlstra EE *et al*: **Serological and virological characterization of clinically diagnosed cases of measles in suburban Khartoum.** *J Clin Microbiol* 2000, **38**(3):987-991.
20. Amela Heras C, Pachon del Amo I: **La Vigilancia Epidemiológica del sarampión en el contexto del "Plan de acción para eliminar el sarampión en España".** *Bol Epidemiol Semanal* 2000, **8**(16):169-172.
21. **Expanded Programme on Immunization (EPI). Standardization of the nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses.** *Wkly Epidemiol Rec* 1998, **73**(35):265-269.
22. **Nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses (update). Part I.** *Wkly Epidemiol Rec* 2001, **76**(32):242-247.
23. **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):229-232.
24. Muller CP, Kremer JR, Best JM, Dourado I, Triki H, Reef S: **Reducing global disease burden of measles and rubella: report of the WHO Steering Committee on research related to measles and rubella vaccines and vaccination, 2005.** *Vaccine* 2007, **25**(1):1-9.
25. **Global distribution of measles and rubella genotypes--update.** *Wkly Epidemiol Rec* 2006, **81**(51/52):474-479.
26. **Global measles and rubella laboratory network--update.** *Wkly Epidemiol Rec* 2005, **80**(44):384-388.
27. Santibanez S, Tischer A, Heider A, Siedler A, Hengel H: **Rapid replacement of endemic measles virus genotypes.** *J Gen Virol* 2002, **83**(Pt 11):2699-2708.
28. Santibanez S, Heider A, Gerike E, Agafonov A, Schreier E: **Genotyping of measles virus isolates from central Europe and Russia.** *J Med Virol* 1999, **58**(3):313-320.

29. Dahl L, Christensen LS, Schoeller S, Westh H, Plesner AM: **Sequence analysis of the hemagglutinin gene of measles virus isolates in Denmark 1997-1998: no evidence of persistent circulation of measles virus in Denmark.** *Apmis* 2000, **108**(4):267-272.
30. Hanses F, van Binnendijk R, Ammerlaan W, Truong AT, de Rond L, Schneider F, Muller CP: **Genetic variability of measles viruses circulating in the Benelux.** *Arch Virol* 2000, **145**(3):541-551.
31. Jin L, Brown DW, Ramsay ME, Rota PA, Bellini WJ: **The diversity of measles virus in the United Kingdom, 1992-1995.** *J Gen Virol* 1997, **78** (Pt 6):1287-1294.
32. Fernández-Muñoz R, Carabana J, Caballero M, Liton PB, Duque BM, García-Villalon MD, Celma ML: **Epidemiología molecular del virus del sarampión.** *Rev Esp Salud Publica* 1999, **73**(5):605-608.
33. Korukluoglu G, Liffick S, Guris D, Kobune F, Rota PA, Bellini WJ, Ceylan A, Ertem M: **Genetic characterization of measles viruses isolated in Turkey during 2000 and 2001.** *Viol J* 2005, **2**:58.
34. Tischer A, Santibanez S, Siedler A, Heider A, Hengel H: **Laboratory investigations are indispensable to monitor the progress of measles elimination--results of the German Measles Sentinel 1999-2003.** *J Clin Virol* 2004, **31**(3):165-178.
35. Atrasheuskaya AV, Blatun EM, Neverov AA, Kameneva SN, Maksimov NL, Karpov IA, Ignatyev GM: **Measles in Minsk, Belarus, 2001-2003: clinical, virological and serological parameters.** *J Clin Virol* 2005, **34**(3):179-185.
36. Mosquera MM, Ory F, Echevarria JE: **Measles virus genotype circulation in Spain after implementation of the national measles elimination plan 2001-2003.** *J Med Virol* 2005, **75**(1):137-146.
37. Zandotti C, Jeantet D, Lambert F, Waku-Kouomou D, Wild F, Freymuth F, Harle JR, de Lamballerie X, Charrel RN: **Re-emergence of measles among young adults in Marseilles, France.** *Eur J Epidemiol* 2004, **19**(9):891-893.
38. Ciofi Degli Atti ML, Filia A, Massari M, Pizzuti R, Nicoletti L, D'Argenzio A, de Campora E, Marchi A, Lombardo A, Salmaso S: **Assessment of measles incidence, measles-related complications and hospitalisations during an outbreak in a southern Italian region.** *Vaccine* 2006, **24**(9):1332-1338.
39. Kremer JR, Nguyen GH, Shulga SV, Nguyen PH, Nguyen UT, Tikhonova NT, Muller CP: **Genotyping of recent measles virus strains from Russia and Vietnam by nucleotide-specific multiplex PCR.** *J Med Virol* 2007, **79**(7):987-994.
40. Forcic D, Ivancic J, Baricevic M, Mahovlic V, Tesovic G, Bozinovic D, Gjenero Margan I, Mazuran R: **Genetic characterization of wild type measles virus isolated in Croatia during the 2003-2004 outbreak.** *J Med Virol* 2005, **75**(2):307-312.
41. Delaporte E, Wyler-Lazarevic CA, Richard JL, Sudre P: **[Contribution of unvaccinated siblings to a measles outbreak in Switzerland].** *Rev Epidemiol Sante Publique* 2004, **52**(6):493-501.

42. Coughlan S, Connell J, Cohen B, Jin L, Hall WW: **Suboptimal measles-mumps-rubella vaccination coverage facilitates an imported measles outbreak in Ireland.** *Clin Infect Dis* 2002, **35**(1):84-86.
43. Kremer JR, Brown KE, Jin L, Santibanez S, Shulga SV, Aboudy Y, Demchyshyna IV, Djemileva S, Echevarria JE, Featherstone DF *et al*: **High genetic diversity of measles virus, World Health Organization European Region, 2005-2006.** *Emerg Infect Dis* 2008, **14**(1):107-114.
44. Chironna M, Prato R, Sallustio A, Martinelli D, Germinario C, Lopalco P, Quarto M: **Genetic characterization of measles virus strains isolated during an epidemic cluster in Puglia, Italy 2006-2007.** *Virology* 2007, **4**:90.
45. Lernout T, Kissling E, Hutse V, De Schrijver K, Top G: **An outbreak of measles in orthodox Jewish communities in Antwerp, Belgium, 2007-2008: different reasons for accumulation of susceptibles.** *Euro Surveill* 2009, **14**(2).
46. Lovoll O, Vonen L, Nordbo SA, Vevatne T, Sagvik E, Vainio K, Sandbu S, Aavitsland P: **Outbreak of measles among Irish Travellers in Norway: an update.** *Euro Surveill* 2007, **12**(6):E070614 070612.
47. Carr MJ, Conway A, Waters A, Moran J, Hassan J, Hall WW, Connell J: **Molecular epidemiology of circulating measles virus in Ireland 2002-2007.** *J Med Virol* 2009, **81**(1):125-129.
48. Heathcock R, Watts C: **Measles outbreaks in London, United Kingdom - a preliminary report.** *Euro Surveill* 2008, **13**(15).
49. Delaporte E, Wyler CA, Sudre P: **Outbreak of measles in Geneva, Switzerland, March-April 2007.** *Euro Surveill* 2007, **12**(19):pii=3190.
50. Bernard H, Santibanez S, Siedler A, Ludwig MS, Fischer R, Hautmann W: **An outbreak of measles in Lower Bavaria, Germany, January-June 2007.** *Euro Surveill* 2007, **12**(40):pii=3278.
51. Shulga SV, Rota PA, Kremer JR, Naumova MA, Muller CP, Tikhonova NT, Lopareva EN, Mamaeva TA, Tsvirkun OV, Mulders MN *et al*: **Genetic variability of wild-type measles viruses, circulating in the Russian Federation during the implementation of the National Measles Elimination Program, 2003-2007.** *Clin Microbiol Infect* 2009, **15**(6):528-537.
52. Makowka A, Gut W, Litwinska B, Santibanez S, Mankertz A: **Genotyping of measles and rubella virus strains circulating in Poland in 2007.** *Euro Surveill* 2007, **12**(43):pii=3295.
53. Groth C, Bottiger B, Plesner A, Christiansen A, Glismann S, Høgh B: **Nosocomial measles cluster in Denmark following an imported case, December 2008-January 2009.** *Euro Surveill* 2009, **14**(8):pii=19126.
54. Caputi G, Tafuri S, Chironna M, Martinelli D, Sallustio A, Falco A, Germinario CA, Prato R, Quarto M: **An outbreak of measles including nosocomial transmission in Apulia, south-east Italy, January-March 2008--a preliminary report.** *Euro Surveill* 2008, **13**(16):pii=18839.

55. Noury U, Stoll J, Haeghebaert S, Antona D, Parent du Chatelet I: **Outbreak of measles in two private religious schools in Bourgogne and Nord-Pas-de-Calais regions of France, May-July 2008 (preliminary results)**. *Euro Surveill* 2008, **13**(35):pii=18961.
56. Muscat M, Hartvig Christiansen A, Bottiger BE, Plesner A, Glismann S: **A cluster of measles cases in Denmark following importation, January and February 2008**. *Euro Surveill* 2008, **13**(9):pii=8050.
57. Follin P, Dotevall L, Jertborn M, Khalid Y, Liljeqvist JA, Muntz S, Qvarfordt I, Soderstrom A, Wiman A, Ahren C *et al*: **Effective control measures limited measles outbreak after extensive nosocomial exposures in January-February 2008 in Gothenburg, Sweden**. *Euro Surveill* 2008, **13**(30):pii=18937.
58. Kumar V: **Measles outbreak in Gibraltar, August-October 2008--a preliminary report**. *Euro Surveill* 2008, **13**(45):pii: 19034.
59. Schmid D, Holzmann H, Schwarz K, Kasper S, Kuo HW, Aberle SW, Redlberger-Fritz M, Hautmann W, Santibanez S, Mankertz A *et al*: **Measles outbreak linked to a minority group in Austria, 2008**. *Epidemiol Infect* 2010, **138**(3):415-425.
60. Pfaff G, Mezger B, Santibanez S, Hoffmann U, Maassen S, Wagner U, Siedler A: **Measles in south-west Germany imported from Switzerland--a preliminary outbreak description**. *Euro Surveill* 2008, **13**(8):pii=8044.
61. van Velzen E, de Coster E, van Binnendijk R, Hahne S: **Measles outbreak in an anthroposophic community in The Hague, The Netherlands, June-July 2008**. *Euro Surveill* 2008, **13**(31):pii=18945.
62. Parent du Chatelet I, Floret D, Antona D, Levy-Bruhl D: **Measles resurgence in France in 2008, a preliminary report**. *Euro Surveill* 2009, **14**(6):pii=19118.
63. **Measles once again endemic in the United Kingdom**. *Euro Surveill* 2008, **13**(27):pii=18919.
64. Amela C, Pachón I: **[Estudio seroepidemiológico: situación de las enfermedades vacunables en España]**. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo; 2000.
65. Bernaola Iturbe E, Giménez Sánchez F, Baca Cots M, De Juan Martín F, Diez Domingo J, Garcés Sánchez M, Gómez-Campderá A, Martínón-Torres F, Picazo JJ, Pineda Solás V: **Calendario vacunal de la Asociación Española de Pediatría: Recomendaciones 2009**. *An Pediatr (Barc)* 2009, **70**(1):72-82.
66. **Measles vaccines**. *Wkly Epidemiol Rec* 2004, **79**(14):130-142.
67. **Asociación Española de Pediatría. Comité Asesor de Vacunas. Vacunas contra el sarampión, rubéola y parotiditis (vacuna triple vírica)**. [Consultado 30/01/2009]. [www.aeped.es/vacunaspav/modulo2/PDFs/Modulo2_6.pdf]
68. **Seizures in childhood**. In: *Nelson textbook of pediatrics*. Edited by Kliegman R, Behrman R, Jenson H, Stanton B, 18th edn. Philadelphia, PA: Saunders; 2007: 2457-2475.
69. **Update: recommendations from the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) regarding administration of combination MMRV vaccine**. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2008, **57**(10):258-260.

70. **Progress in reducing global measles deaths: 1999-2004.** *Wkly Epidemiol Rec* 2006, **81**(10):90-94.
71. **Global measles mortality, 2000--2008.** *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009, **58**(47):1321-1326.
72. Zarocostas J: **Mortality from measles fell by 91% in Africa from 2000 to 2006.** *Bmj* 2007, **335**(7631):1173.
73. Muscat M, Bang H, Wohlfahrt J, Glismann S, Molbak K: **Measles in Europe: an epidemiological assessment.** *Lancet* 2009, **373**(9661):383-389.
74. **Eliminating measles and rubella and preventing congenital rubella infection. WHO European Region Strategic Plan 2005-2010** [<http://www.euro.who.int/Document/E87772.pdf>]
75. **Progress towards elimination of measles and prevention of congenital rubella infection in the WHO European Region, 1990-2004.** *Wkly Epidemiol Rec* 2005, **80**(8):66-71.
76. Mulders M, Lipskaya G, Spika J: **Genotype analysis of measles outbreaks in the WHO European Region 2005-2006.** *Journal of Clinical Virology* 2006, **36**(S3):S13.
77. Martin R, Deshevoi S, Buddha N, Jankovic D: **Approaching measles and rubella elimination in the European Region--need to sustain the gains.** *Euro Surveill* 2009, **14**(50):pii=19449.
78. Spika J: **Measles and rubella in Europe-reaching for elimination.** *Journal of Clinical Virology* 2006, **36**(Suppl 3):S3-S4.
79. Martinez de Aragon MV, Castellanos T, Cortés M: **Eliminación del sarampión en España. Plan Nacional de Eliminación del Sarampión. Evaluación Año 2004.** *Bol Epidemiol Semanal* 2005, **13**(5):49-60.
80. Amela Heras C, Pachon del Amo I, Sanz Ortiz MC, Peña-Rey I: **Plan de eliminación del sarampión. Evaluación del año 2001 y primer semestre del año 2002.** *Bol Epidemiol Semanal* 2002, **10**(18):185-188.
81. Peña-Rey I, Castellanos T, Alcalde E, Masa J: **Plan Nacional de Eliminación del Sarampión. España 2008.** *Bol Epidemiol Semanal* 2009, **17**(8):85-92.
82. **00.073. Togaviridae** [<http://phene.cpmc.columbia.edu/ICTVdB/00.073.htm>]
83. Weir E, Sider D: **A refresher on rubella.** *Cmaj* 2005, **172**(13):1680-1681.
84. Hobman T, Chantler J: **Rubella virus.** In: *Fields Virology*. Edited by Knipe DM, Howley PM, vol. 1, 5th edn. Philadelphia, PA: Lippincot, Williams & Wilkins. Wolters Kluwer Health; 2007: 1069-1100.
85. **Rubella vaccines.** *Wkly Epidemiol Rec* 2000, **75**(20):161-169.
86. Robertson SE, Featherstone DA, Gacic-Dobo M, Hersh BS: **Rubella and congenital rubella syndrome: global update.** *Rev Panam Salud Publica* 2003, **14**(5):306-315.
87. **Guidelines for surveillance of congenital rubella syndrome and rubella, field test version, May 1999.** [<http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF99/www9934.pdf>]

88. **Standardization of the nomenclature for genetic characteristics of wild-type rubella viruses.** *Wkly Epidemiol Rec* 2005, **80**(14):126-132.
89. **Update of standard nomenclature for wild-type rubella viruses, 2007.** *Wkly Epidemiol Rec* 2007, **82**(24):216-222.
90. **Progress toward measles elimination--European Region, 2005--2008.** *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009, **58**(6):142-145.
91. Masa J, Peña-Rey I, Castellanos T, Martínez de Aragón MV, Alcalde E: **Informe Anual del Plan de Eliminación de la Rubéola y del Síndrome de Rubéola Congénita. España año 2008.** In: Edited by Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica de España. Madrid: Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III.; 2009: 1-27.
92. Tenorio Matanzo A, Corachán Cuyás M: **Infecciones por arbovirus y virus de fiebres hemorrágicas.** In: *Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* Edited by Ausina Ruiz V, Moreno Guillén S. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2006: 931-937.
93. Banatvala JE, Brown DW: **Rubella.** *Lancet* 2004, **363**(9415):1127-1137.
94. Mosquera MM, de Ory F, Gallardo V, Cuenca L, Morales M, Sanchez-Yedra W, Cabezas T, Hernandez JM, Echevarria JE: **Evaluation of diagnostic markers for measles virus infection in the context of an outbreak in Spain.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**(10):5117-5121.
95. Montejo Baranda M, Aguirrebengoa Ibarguren K: **Infecciones por Parvovirus B19.** In: *Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* Edited by Ausina Ruiz V, Moreno Guillen S. Madrid: Editorial Médica Panamericana, S. A.; 2006: 801-805.
96. **00.050.1. Parvovirinae** [<http://phene.cpmc.columbia.edu/ICTVdB/WWW/0501SFAM.htm>]
97. Berns K, Parrish CR: **Parvoviridae.** In: *Fields Virology.* Edited by Knipe DM, Howley PM, vol. 2, 5th edn. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins. Wolters Kluwer Health; 2007: 2437-2477.
98. Corcoran A, Doyle S: **Advances in the biology, diagnosis and host-pathogen interactions of parvovirus B19.** *J Med Microbiol* 2004, **53**(Pt 6):459-475.
99. Cassinotti P, Siegl G, Michel BA, Bruhlmann P: **Presence and significance of human parvovirus B19 DNA in synovial membranes and bone marrow from patients with arthritis of unknown origin.** *J Med Virol* 1998, **56**(3):199-204.
100. Corcioli F, Zakrzewska K, Rinieri A, Fanci R, Innocenti M, Civinini R, De Giorgi V, Di Lollo S, Azzi A: **Tissue persistence of parvovirus B19 genotypes in asymptomatic persons.** *J Med Virol* 2008, **80**(11):2005-2011.
101. Soderlund M, von Essen R, Haapasaari J, Kiistala U, Kiviluoto O, Hedman K: **Persistence of parvovirus B19 DNA in synovial membranes of young patients with and without chronic arthropathy.** *Lancet* 1997, **349**(9058):1063-1065.
102. Bloom ME, Young NS: **Parvoviruses.** In: *Fields Virology.* Edited by Knipe DM, Howley PM, vol. 2, 4th edn. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams and Wilkins; 2001: 2361-2379.
103. Heegaard ED, Brown KE: **Human parvovirus B19.** *Clin Microbiol Rev* 2002, **15**(3):485-505.

104. Servant A, Laperche S, Lallemand F, Marinho V, De Saint Maur G, Meritet JF, Garbarg-Chenon A: **Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three genotypes.** *J Virol* 2002, **76**(18):9124-9134.
105. Parsyan A, Szmaragd C, Allain JP, Candotti D: **Identification and genetic diversity of two human parvovirus B19 genotype 3 subtypes.** *J Gen Virol* 2007, **88**(Pt 2):428-431.
106. Toan NL, Duechting A, Kremsner PG, Song le H, Ebinger M, Aberle S, Binh VQ, Duy DN, Torresi J, Kandolf R *et al.*: **Phylogenetic analysis of human parvovirus B19, indicating two subgroups of genotype 1 in Vietnamese patients.** *J Gen Virol* 2006, **87**(Pt 10):2941-2949.
107. Saldanha J, Lelie N, Yu MW, Heath A: **Establishment of the first World Health Organization International Standard for human parvovirus B19 DNA nucleic acid amplification techniques.** *Vox Sang* 2002, **82**(1):24-31.
108. Calicó Bosch I, Navas Elorza E: **Infecciones por adenovirus.** In: *Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Edited by Ausina Ruiz V, Moreno Guillén S. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2006: 775-781.
109. Casas I, Avellon A, Mosquera M, Jabado O, Echevarria JE, Campos RH, Rewers M, Perez-Brena P, Lipkin WI, Palacios G: **Molecular identification of adenoviruses in clinical samples by analyzing a partial hexon genomic region.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**(12):6176-6182.
110. Ramsay M, Reacher M, O'Flynn C, Buttery R, Hadden F, Cohen B, Knowles W, Wreghitt T, Brown D: **Causes of morbilliform rash in a highly immunised English population.** *Arch Dis Child* 2002, **87**(3):202-206.
111. Farnig KT, Wu KG, Lee YS, Lin YH, Hwang BT: **Comparison of clinical characteristics of adenovirus and non-adenovirus pneumonia in children.** *J Microbiol Immunol Infect* 2002, **35**(1):37-41.
112. Fortuny Guash C, Pumarola Suñé T: **Infecciones por enterovirus: virus coxsackie, echovirus y nuevos enterovirus.** In: *Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Edited by Ausina Ruiz V, Moreno Guillén S. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2006: 893-901.
113. Nelson D, Hiemstra H, Minor T, D'Alessio D: **Non-polio enterovirus activity in Wisconsin based on a 20-year experience in a diagnostic virology laboratory.** *Am J Epidemiol* 1979, **109**(3):352-361.
114. Morens DM, Zweighaft RM, Bryan JM: **Non-polio enterovirus disease in the United States, 1971--1975.** *Int J Epidemiol* 1979, **8**(1):49-54.
115. Davidkin I, Valle M, Peltola H, Hovi T, Paunio M, Roivainen M, Linnavuori K, Jokinen S, Leinikki P: **Etiology of measles- and rubella-like illnesses in measles, mumps, and rubella-vaccinated children.** *J Infect Dis* 1998, **178**(6):1567-1570.
116. Abzug MJ: **Presentation, diagnosis, and management of enterovirus infections in neonates.** *Paediatr Drugs* 2004, **6**(1):1-10.

117. Abzug MJ, Levin MJ, Rotbart HA: **Profile of enterovirus disease in the first two weeks of life.** *Pediatr Infect Dis J* 1993, **12**(10):820-824.
118. Lake AM, Lauer BA, Clark JC, Wesenberg RL, McIntosh K: **Enterovirus infections in neonates.** *J Pediatr* 1976, **89**(5):787-791.
119. Syriopoulou VP, Hadjichristodoulou C, Daikos GL, Pirounaki M, Chatzicou V, Pavlopoulou I, Anagnostakou M, Theodoridou M, Dellagrammaticas H: **Clinical and epidemiological aspects of an enterovirus outbreak in a neonatal unit.** *J Hosp Infect* 2002, **51**(4):275-280.
120. Takami T, Sonodat S, Houjyo H, Kawashima H, Takei Y, Miyajima T, Takekuma K, Hoshika A, Mori T, Nakayama T: **Diagnosis of horizontal enterovirus infections in neonates by nested PCR and direct sequence analysis.** *J Hosp Infect* 2000, **45**(4):283-287.
121. Yang TT, Huang LM, Lu CY, Kao CL, Lee WT, Lee PI, Chen CM, Huang FY, Lee CY, Chang LY: **Clinical features and factors of unfavorable outcomes for non-polio enterovirus infection of the central nervous system in northern Taiwan, 1994-2003.** *J Microbiol Immunol Infect* 2005, **38**(6):417-424.
122. Tardieu M, Dussaix E, Lebon P, Landrieu P: **[Prospective study of 59 cases of viral meningitis in children. Clinical and virologic diagnosis. Epidemiology and physiopathology].** *Arch Fr Pediatr* 1986, **43**(1):9-14.
123. Pozo Sánchez F, Prada Pardal JL: **Infecciones por herpesvirus humanos tipos 6, 7 y 8. Herpesvirus B.** In: *Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* Edited by Ausina Ruiz V, Moreno Guillén S. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2006: 769-774.
124. Pérez Sáenz JL, Cisneros Herreros JM: **Infecciones por citomegalovirus.** In: *Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* Edited by Ausina Ruiz V, Moreno Guillén S. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2006: 747-757.
125. de Ory F, Echevarria JM: **Valoración de criterios serológicos para el diagnóstico de mononucleosis infecciosa.** *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1989, **7**(9):485-488.
126. Lumbreras Bermejo C, Rodríguez Otero JJ: **Infecciones por el virus de Epstein-Barr.** In: *Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* Edited by Ausina Ruiz V, Moreno Guillén S. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2006: 759-768.
127. **00.026.0.01.013. Dengue virus**
[<http://phene.cpmc.columbia.edu/EntVir/Data/www/26001013.htm>]
128. Domingo C, de Ory F, Sanz JC, Reyes N, Gascon J, Wichmann O, Puente S, Schunk M, Lopez-Velez R, Ruiz J *et al*: **Molecular and serologic markers of acute dengue infection in naive and flavivirus-vaccinated travelers.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009, **65**(1):42-48.
129. Gubler DJ, Kuno G, Markoff L: **Flaviviruses.** In: *Fields Virology.* Edited by Knipe DM, Howley PM, vol. 1, 5th edn. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins. Wolters Kluwer Health; 2007: 1153-1252.
130. Saldanha J, Minor P: **Collaborative study to assess the suitability of a proposed working reagent for human parvovirus B19 DNA detection in plasma pools by gene**

- amplification techniques. B19 Collaborative Study Group. *Vox Sang* 1997, 73(4):207-211.**
131. Bellini WJ, Rota PA: **Genetic diversity of wild-type measles viruses: implications for global measles elimination programs. *Emerg Infect Dis* 1998, 4(1):29-35.**
 132. Carlson J, Artsob H, Douville-Fradet M, Duclos P, Fearon M, Ratnam S, Tipples G, Varughese P, Ward B, Sciberras J: **Measles surveillance: guidelines for laboratory support. Working Group on Measles Elimination. *Can Commun Dis Rep* 1998, 24(5):33-44.**
 133. Evengard B, Linder E, Lundbergh P: **Standardization of a filter-paper technique for blood sampling. *Ann Trop Med Parasitol* 1988, 82(3):295-303.**
 134. Casas I, Tenorio A, Echevarria JM, Klapper PE, Cleator GM: **Detection of enteroviral RNA and specific DNA of herpesviruses by multiplex genome amplification. *J Virol Methods* 1997, 66(1):39-50.**
 135. Mosquera MM, de Ory F, Moreno M, Echevarria JE: **Simultaneous detection of measles virus, rubella virus, and parvovirus B19 by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2002, 40(1):111-116.**
 136. Avellon A, Perez P, Aguilar JC, Lejarazu R, Echevarria JE: **Rapid and sensitive diagnosis of human adenovirus infections by a generic polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 2001, 92(2):113-120.**
 137. de Ory F, Antonaya J, Fernandez MV, Echevarria JM: **Application of low-avidity immunoglobulin G studies to diagnosis of Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *J Clin Microbiol* 1993, 31(6):1669-1671.**
 138. Casas I, Powell L, Klapper PE, Cleator GM: **New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J Virol Methods* 1995, 53(1):25-36.**
 139. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG: **The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 1997, 25:4876-4882.**
 140. Hall TA: **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 1999, 41:95-98.**
 141. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S: **MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007, 24(8):1596-1599.**
 142. Kumar S, Tamura K, Nei M: **MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 2004, 5(2):150-163.**
 143. Nei M, Kumar S: **Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford: Oxford University Press, Inc.; 2000.**
 144. Luria SE, Darnell JE: **Virología General. Barcelona: Ediciones Omega; 1977.**
 145. de Ory F: **Evaluación de un ensayo de enzoinmunoanálisis (ELISA) de captura para el diagnóstico de la infección por virus del sarampión. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2001, 19(8):409-411.**

146. Riddell MA, Leydon JA, Catton MG, Kelly HA: **Detection of measles virus-specific immunoglobulin M in dried venous blood samples by using a commercial enzyme immunoassay.** *J Clin Microbiol* 2002, **40**(1):5-9.
147. Mosquera MM, Echevarria JE, Puente S, Lahulla F, de Ory F: **Use of whole blood dried on filter paper for detection and genotyping of measles virus.** *J Virol Methods* 2004, **117**(1):97-99.
148. Hanses F, Truong AT, Ammerlaan W, Ikusika O, Adu F, Oyefolu AO, Omilabu SA, Muller CP: **Molecular epidemiology of Nigerian and Ghanaian measles virus isolates reveals a genotype circulating widely in western and central Africa.** *J Gen Virol* 1999, **80** (Pt 4):871-877.
149. Kouomou DW, Nerrienet E, Mfoupouendoun J, Tene G, Whittle H, Wild TF: **Measles virus strains circulating in Central and West Africa: Geographical distribution of two B3 genotypes.** *J Med Virol* 2002, **68**(3):433-440.
150. Mulders MN, Truong AT, Muller CP: **Monitoring of measles elimination using molecular epidemiology.** *Vaccine* 2001, **19**(17-19):2245-2249.
151. Truong AT, Kreis S, Ammerlaan W, Hartter HK, Adu F, Omilabu SA, Oyefolu AO, Berbers GA, Muller CP: **Genotypic and antigenic characterization of hemagglutinin proteins of African measles virus isolates.** *Virus Res* 1999, **62**(1):89-95.
152. **Outbreak of measles in Doncaster.** In: *Communicable Disease Report Weekly.* Health Protection Agency.; 2006: <http://www.hpa.org.uk/cdr/archives/2006/cdr1506.pdf>.
153. Boncompagni G, Incandela L, Bechini A, Giannini D, Cellini C, Trezzi M, Ciofi degli Atti ML, Ansaldi F, Valle L, Bonanni P: **Measles outbreak in Grosseto, central Italy, 2006.** *Euro Surveill* 2006, **11**(8):E060803 060804.
154. Filia A, Curtale F, Kreidl P, Morosetti G, Nicoletti L, Perrelli F, Mantovani J, Campus D, Rossi G, Sanna MC *et al*: **Cluster of measles cases in the Roma/Sinti population, Italy, June-September 2006.** *Euro Surveill* 2006, **11**(41).
155. Gouandjika-Vasilache I, Waku-Kouomou D, Menard D, Beyrand C, Guye F, Ngoay-Kossy JC, Selekon B, Wild TF: **Cocirculation of measles virus genotype B2 and B3.1 in Central African Republic during the 2000 measles epidemic.** *J Med Virol* 2006, **78**(7):964-970.
156. Waku-Kouomou D, Alla A, Blanquier B, Jeantet D, Caidi H, Rguig A, Freymuth F, Wild FT: **Genotyping measles virus by real-time amplification refractory mutation system PCR represents a rapid approach for measles outbreak investigations.** *J Clin Microbiol* 2006, **44**(2):487-494.
157. El Mubarak HS, van de Bildt MW, Mustafa OA, Vos HW, Mukhtar MM, Ibrahim SA, Andeweg AC, El Hassan AM, Osterhaus AD, de Swart RL: **Genetic characterization of wild-type measles viruses circulating in suburban Khartoum, 1997-2000.** *J Gen Virol* 2002, **83**(Pt 6):1437-1443.
158. Mulders MN, Nebie YK, Fack F, Kapitanyuk T, Sanou O, Valea DC, Muyembe-Tamfum JJ, Ammerlaan W, Muller CP: **Limited diversity of measles field isolates after a national**

- immunization day in Burkina Faso: progress from endemic to epidemic transmission? *J Infect Dis* 2003, **187** Suppl 1:S277-282.
159. Alla A, Waku-Kouomou D, Benjouad A, Elaouad R, Wild TF: **Rapid diversification of measles virus genotypes circulating in Morocco during 2004-2005 epidemics.** *J Med Virol* 2006, **78**(11):1465-1472.
160. Garcia-Comas L: **Measles outbreak in the region of Madrid, Spain, 2006.** *Euro Surveill* 2006, **11**(3):pii=2933.
161. **Measles Outbreak Reported in Venezuela.** *Immunization Newsletter* 2006, **28**(2):1-2.
162. Peña-Rey I, Castellanos T, Alcalde E, Martínez de Aragón MV: **Plan Nacional de Eliminación del Sarampión. España, 2006.** *Bol Epidemiol Semanal* 2007, **15**(6):61-68.
163. Fernández-Muñoz R, Carabana J, Caballero M, Liton PB, Duque BM, García-Villalón MD, Celma ML: **Epidemiología molecular del virus del sarampión.** *Rev Esp Salud Publica* 1999, **73**(5):605-608.
164. Rima BK, Earle JA, Baczko K, ter Meulen V, Liebert UG, Carstens C, Carabana J, Caballero M, Celma ML, Fernandez-Munoz R: **Sequence divergence of measles virus haemagglutinin during natural evolution and adaptation to cell culture.** *J Gen Virol* 1997, **78** (Pt 1):97-106.
165. Alla A, Liffick SL, Newton BR, Elaouad R, Rota PA, Bellini WJ: **Genetic analysis of measles viruses isolated in Morocco.** *J Med Virol* 2002, **68**(3):441-444.
166. Dominguez A, Torner N, Barrabeig I, Rovira A, Rius C, Cayla J, Plasencia E, Minguell S, Sala MR, Martinez A *et al*: **Large outbreak of measles in a community with high vaccination coverage: implications for the vaccination schedule.** *Clin Infect Dis* 2008, **47**(9):1143-1149.
167. Nieto-Vera J, Masa-Calles J, Davila J, Molina-Font J, Jimenez M, Gallardo-Garcia V, Mayoral-Cortes JM: **An outbreak of measles in Algeciras, Spain, 2008--a preliminary report.** *Euro Surveill* 2008, **13**(20):pii=18872.
168. Chibo D, Riddell M, Catton M, Lyon M, Lum G, Birch C: **Studies of measles viruses circulating in Australia between 1999 and 2001 reveals a new genotype.** *Virus Res* 2003, **91**(2):213-221.
169. Perucha M, Ramalle-Gomare E, Lezaun ME, Blanco A, Quiñones C, Blasco M, Gonzalez MA, Cuesta C, Echevarria Mayo JE, Mosquera MM *et al*: **A measles outbreak in children under 15 months of age in La Rioja, Spain, 2005-2006.** *Euro Surveill* 2006, **11**(10):267-270.
170. van Treeck U: **Measles outbreak in Germany: over 1000 cases now reported in Nordrhein Westfalen.** *Euro Surveill* 2006, **11**(19):pii=2955.
171. van Treeck U, Wichmann O: **Measles outbreak in Germany: update.** *Euro Surveill* 2006, **11**(15):pii=2939.
172. Colombo M, Bourhis JM, Chamontin C, Soriano C, Villet S, Costanzo S, Couturier M, Belle V, Fournel A, Darbon H *et al*: **The interaction between the measles virus nucleoprotein and the Interferon Regulator Factor 3 relies on a specific cellular environment.** *Virology* 2009, **6**:59.

173. Laine D, Trescol-Biemont MC, Longhi S, Libeau G, Marie JC, Vidalain PO, Azocar O, Diallo A, Canard B, Rabourdin-Combe C *et al*: **Measles virus (MV) nucleoprotein binds to a novel cell surface receptor distinct from FcγRII via its C-terminal domain: role in MV-induced immunosuppression.** *J Virol* 2003, **77**(21):11332-11346.
174. Giraudon P, Buckland R, Wild TF: **The immune response to measles virus in mice. T-helper response to the nucleoprotein and mapping of the T-helper epitopes.** *Virus Res* 1992, **22**(1):41-54.
175. Zvirbliene A, Kucinskaite I, Sezaite I, Samuel D, Sasnauskas K: **Mapping of B cell epitopes in measles virus nucleocapsid protein.** *Arch Virol* 2007, **152**(1):25-39.
176. Kuhne M, Brown DW, Jin L: **Genetic variability of measles virus in acute and persistent infections.** *Infect Genet Evol* 2006, **6**(4):269-276.
177. Bosma TJ, Corbett KM, O'Shea S, Banatvala JE, Best JM: **PCR for detection of rubella virus RNA in clinical samples.** *J Clin Microbiol* 1995, **33**(5):1075-1079.
178. Cassinotti P, Weitz M, Siegl G: **Human parvovirus B19 infections: routine diagnosis by a new nested polymerase chain reaction assay.** *J Med Virol* 1993, **40**(3):228-234.
179. Clewley JP: **Polymerase chain reaction assay of parvovirus B19 DNA in clinical specimens.** *J Clin Microbiol* 1989, **27**(12):2647-2651.
180. Fridell E, Bekassy AN, Larsson B, Eriksson BM: **Polymerase chain reaction with double primer pairs for detection of human parvovirus B19 induced aplastic crises in family outbreaks.** *Scand J Infect Dis* 1992, **24**(3):275-282.
181. Hornsleth A, Carlsen KM, Christensen LS, Gundestrup M, Heegaard ED, Myhre J: **Estimation of serum concentration of parvovirus B19 DNA by PCR in patients with chronic anaemia.** *Res Virol* 1994, **145**(6):379-386.
182. Ho-Terry L, Terry GM, Londesborough P: **Diagnosis of foetal rubella virus infection by polymerase chain reaction.** *J Gen Virol* 1990, **71** (Pt 7):1607-1611.
183. Koch WC, Adler SP: **Detection of human parvovirus B19 DNA by using the polymerase chain reaction.** *J Clin Microbiol* 1990, **28**(1):65-69.
184. Kovacs BW, Carlson DE, Shahbahrani B, Platt LD: **Prenatal diagnosis of human parvovirus B19 in nonimmune hydrops fetalis by polymerase chain reaction.** *Am J Obstet Gynecol* 1992, **167**(2):461-466.
185. Nakayama T, Mori T, Yamaguchi S, Sonoda S, Asamura S, Yamashita R, Takeuchi Y, Urano T: **Detection of measles virus genome directly from clinical samples by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and genetic variability.** *Virus Res* 1995, **35**(1):1-16.
186. Patou G, Pillay D, Myint S, Pattison J: **Characterization of a nested polymerase chain reaction assay for detection of parvovirus B19.** *J Clin Microbiol* 1993, **31**(3):540-546.
187. Revello MG, Baldanti F, Sarasini A, Zavattoni M, Torsellini M, Gerna G: **Prenatal diagnosis of rubella virus infection by direct detection and semiquantitation of viral RNA in clinical samples by reverse transcription-PCR.** *J Clin Microbiol* 1997, **35**(3):708-713.

188. Schwarz TF, Jager G, Holzgreve W, Roggendorf M: **Diagnosis of human parvovirus B19 infections by polymerase chain reaction.** *Scand J Infect Dis* 1992, **24**(6):691-696.
189. Sevall JS: **Detection of parvovirus B19 by dot-blot and polymerase chain reaction.** *Mol Cell Probes* 1990, **4**(3):237-246.
190. Shimizu H, McCarthy CA, Smaron MF, Burns JC: **Polymerase chain reaction for detection of measles virus in clinical samples.** *J Clin Microbiol* 1993, **31**(5):1034-1039.
191. Tanemura M, Suzumori K, Yagami Y, Katow S: **Diagnosis of fetal rubella infection with reverse transcription and nested polymerase chain reaction: a study of 34 cases diagnosed in fetuses.** *Am J Obstet Gynecol* 1996, **174**(2):578-582.
192. Yamakawa Y, Oka H, Hori S, Arai T, Izumi R: **Detection of human parvovirus B19 DNA by nested polymerase chain reaction.** *Obstet Gynecol* 1995, **86**(1):126-129.
193. Kreis S, Schoub BD: **Partial amplification of the measles virus nucleocapsid gene from stored sera and cerebrospinal fluids for molecular epidemiological studies.** *J Med Virol* 1998, **56**(2):174-177.
194. Matsuzono Y, Narita M, Ishiguro N, Togashi T: **Detection of measles virus from clinical samples using the polymerase chain reaction.** *Arch Pediatr Adolesc Med* 1994, **148**(3):289-293.
195. Riddell MA, Chibo D, Kelly HA, Catton MG, Birch CJ: **Investigation of optimal specimen type and sampling time for detection of measles virus RNA during a measles epidemic.** *J Clin Microbiol* 2001, **39**(1):375-376.
196. van Binnendijk RS, van den Hof S, van den Kerkhof H, Kohl RH, Woonink F, Berbers GA, Conyn-van Spaendonck MA, Kimman TG: **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):898-903.
197. Fayolle J, Verrier B, Buckland R, Wild TF: **Characterization of a natural mutation in an antigenic site on the fusion protein of measles virus that is involved in neutralization.** *J Virol* 1999, **73**(1):787-790.
198. Finsterbusch T, Wolbert A, Deitemeier I, Meyer K, Mosquera MM, Mankertz A, Santibanez S: **Measles viruses of genotype H1 evade recognition by vaccine-induced neutralizing antibodies targeting the linear haemagglutinin noose epitope.** *J Gen Virol* 2009.
199. Liebert UG, Flanagan SG, Loffler S, Baczko K, ter Meulen V, Rima BK: **Antigenic determinants of measles virus hemagglutinin associated with neurovirulence.** *J Virol* 1994, **68**(3):1486-1493.
200. Manchester M, Eto DS, Valsamakis A, Liton PB, Fernandez-Munoz R, Rota PA, Bellini WJ, Forthal DN, Oldstone MB: **Clinical isolates of measles virus use CD46 as a cellular receptor.** *J Virol* 2000, **74**(9):3967-3974.
201. Bustin SA, Nolan T: **Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction.** *J Biomol Tech* 2004, **15**(3):155-166.
202. Xiao XL, Wu H, Li YJ, Li HF, He YQ, Chen G, Zhang JW, Yang H, Li XF, Yang XQ *et al*: **Simultaneous detection of enterovirus 70 and coxsackievirus A24 variant by**

- multiplex real-time RT-PCR using an internal control.** *J Virol Methods* 2009, **159**(1):23-28.
203. Ratnam S, Tipples G, Head C, Fauvel M, Fearon M, Ward BJ: **Performance of indirect immunoglobulin M (IgM) serology tests and IgM capture assays for laboratory diagnosis of measles.** *J Clin Microbiol* 2000, **38**(1):99-104.
204. Mancini AJ: **Exanthems in childhood: an update.** *Pediatr Ann* 1998, **27**(3):163-170.
205. Ward KN: **The natural history and laboratory diagnosis of human herpesviruses-6 and -7 infections in the immunocompetent.** *J Clin Virol* 2005, **32**(3):183-193.
206. Zerr DM, Meier AS, Selke SS, Frenkel LM, Huang ML, Wald A, Rhoads MP, Nguy L, Bornemann R, Morrow RA *et al*: **A population-based study of primary human herpesvirus 6 infection.** *N Engl J Med* 2005, **352**(8):768-776.
207. Peña-Rey I, Martínez de Aragon V, Mosquera M, de Ory F, Echevarria JE: **Measles risk groups in Spain: implications for the European measles-elimination target.** *Vaccine* 2009, **27**(30):3927-3934.
208. Rodríguez Valín ME: **Comentario epidemiológico de las Enfermedades de Declaración Obligatoria y Sistema de Información Microbiológica. España. Año 2004.** *Bol Epidemiol Semanal* 2005, **13**(10):109-120.
209. Bertram G, Dreiner N, Krueger GR, Ramon A, Ablashi DV, Salahuddin SZ, Balachandram N: **Frequent double infection with Epstein-Barr virus and human herpesvirus-6 in patients with acute infectious mononucleosis.** *In Vivo* 1991, **5**(3):271-279.
210. Navalpotro D, Gimeno C, Navarro D: **Concurrent detection of human herpesvirus type 6 and measles-specific IgMs during acute exanthematic human parvovirus B19 infection.** *J Med Virol* 2006, **78**(11):1449-1451.
211. Wananukul S, Nopponpunth V, Poovorawan Y: **Human herpesvirus infection in children with fever and maculopapular rash.** *Asian Pac J Allergy Immunol* 2003, **21**(4):217-221.
212. Rota J, Lowe L, Rota P, Bellini W, Redd S, Dayan G, van Binnendijk R, Hahne S, Tipples G, Macey J *et al*: **Identical genotype B3 sequences from measles patients in 4 countries, 2005.** *Emerg Infect Dis* 2006, **12**(11):1779-1781.
213. Holm-Hansen C, Vainio K: **Sequencing of viral genes.** *Methods Mol Biol* 2009, **551**:203-215.
214. Bankamp B, Lopareva EN, Kremer JR, Tian Y, Clemens MS, Patel R, Fowlkes AL, Kessler JR, Muller CP, Bellini WJ *et al*: **Genetic variability and mRNA editing frequencies of the phosphoprotein genes of wild-type measles viruses.** *Virus Res* 2008, **135**(2):298-306.
215. **Outbreaks of measles in Germany, 2006.** *Euro Surveill* 2006, **11**(12):pii=2926.
216. Bernard H, Fischer R, Wild F: **Ongoing measles outbreak in southern Bavaria, Germany.** *Euro Surveill* 2008, **13**(1):pii=8002.
217. Filia A, Barale A, Malaspina S, Montu D, Zito S, Muscat M, Ciofi Degli Atti ML: **A cluster of measles cases in northern Italy: a preliminary report.** *Euro Surveill* 2007, **12**(48):pii=3318.

218. Gíria M, Rebelo-de-Andrade H, Fernandes T, Pedro S, Freitas G: **Report on the measles situation in Portugal.** *Euro Surveill* 2008, **13**(42):pii=19010.
219. Rota PA, Bellini WJ: **Update on the global distribution of genotypes of wild type measles viruses.** *J Infect Dis* 2003, **187** Suppl 1:S270-276.
220. Siedler A, Tischer A, Mankertz A, Santibanez S: **Two outbreaks of measles in Germany 2005.** *Euro Surveill* 2006, **11**(4):pii=615.
221. Waku-Kouomou D, Landreau D, Olivier S, Palmyre P, Benoit-Catin T, Freymuth F, Wild TF: **Molecular characterization of measles virus circulating in the Indian Ocean Islands during 2005-2006 and in France in 2006.** *J Med Virol* 2007, **79**(9):1381-1387.
222. Horm SV, Dumas C, Svay S, Feldon K, Reynes JM: **Genetic characterization of wild-type measles viruses in Cambodia.** *Virus Res* 2003, **97**(1):31-37.
223. Mbugua FM, Okoth FA, Gray M, Kamau T, Kalu A, Eggers R, Borus P, Kombich J, Langat A, Maritim P *et al*: **Molecular epidemiology of measles virus in Kenya.** *J Med Virol* 2003, **71**(4):599-604.
224. Truong AT, Mulders MN, Gautam DC, Ammerlaan W, de Swart RL, King CC, Osterhaus AD, Muller CP: **Genetic analysis of Asian measles virus strains--new endemic genotype in Nepal.** *Virus Res* 2001, **76**(1):71-78.
225. Zhou J, Fujino M, Inou Y, Kumada A, Aoki Y, Iwata S, Nakayama T: **H1 genotype of measles virus was detected in outbreaks in Japan after 2000.** *J Med Virol* 2003, **70**(4):642-648.
226. Peña-Rey I, Castellanos T, Alcalde E, Salamanca L, Martínez de Aragón MV: **Plan Nacional de eliminación del Sarampión. España 2007.** *Bol Epidemiol Semanal* 2008, **16**(4):37-48.
227. **Plan to eliminate indigenous transmission of measles in the English-speaking Caribbean countries.** *Bull Pan Am Health Organ* 1990, **24**(2):240-246.
228. Riddell MA, Rota JS, Rota PA: **Review of the temporal and geographical distribution of measles virus genotypes in the prevaccine and postvaccine eras.** *Virology* 2005, **2**:87.
229. Peña-Rey I, Sanz Ortiz C, Amela Heras C: **Plan Nacional de Eliminación del Sarampión. Evaluación del año 2002.** *Bol Epidemiol Semanal* 2003, **11**(7):73-84.
230. Spika JS, Aidyralieva C, Mukharskaya L, Kostyuchenko NN, Mulders M, Lipskaya G, Emiroglu N: **Measles outbreak in the Ukraine, 2005-2006.** *Euro Surveill* 2006, **11**(10):pii=2918.
231. Kokotas SN, Bolanaki E, Sgouras D, Pogka V, Logotheti M, Kossivakis A, Horefti E, Papadacos K, Mentis A: **Cocirculation of genotypes D4 and D6 in Greece during the 2005 to 2006 measles epidemic.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008, **62**(1):58-66.
232. Muscat M, Vinner L, Christiansen AH, Glismann S, Bottiger BE: **The benefit of molecular characterization during a measles upsurge in Denmark.** *Vaccine* 2007, **25**(33):6232-6236.

ARTÍCULOS

Simultaneous Detection of Measles Virus, Rubella Virus, and Parvovirus B19 by Using Multiplex PCR

María del Mar Mosquera,^{1*} Fernando de Ory,¹ Mónica Moreno,² and Juan E. Echevarría¹

Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda,¹ and Centro de Atención Primaria de Galapagar, Madrid,² Spain

Received 26 July 2001/Returned for modification 19 September 2001/Accepted 15 October 2001

We describe here a multiplex reverse transcription-PCR (RTMNP-PCR) assay designed to detect and differentiate measles virus, rubella virus, and parvovirus B19. Serial dilution experiments with vaccine strains that compared cell culture isolation of measles in B95 cells and rubella in RK13 cells showed sensitivity rates of 0.004 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀) for measles virus and 0.04 TCID₅₀ for rubella virus. This RTMNP-PCR can detect as few as 10 molecules for measles virus and rubella virus and one molecule for parvovirus B19 in dilution experiments with plasmids containing inserts of the primary reaction amplification products. Five pharyngeal exudates from measles patients and 2 of 15 cerebrospinal fluid samples from measles-related encephalitis were found to be positive for measles virus by this RTMNP-PCR. A total of 3 of 27 pharyngeal exudates from vaccinated children and 2 pharyngeal exudates, plus one urine sample from a case of congenital rubella syndrome, were found to be positive for rubella virus by RTMNP-PCR, whereas 16 of 19 sera from patients with erythema infectiosum were determined to be positive for parvovirus B19 by RTMNP-PCR. In view of these results, we can assess that this method is a useful tool in the diagnosis of these three viruses and could be used as an effective surveillance tool in measles eradication programs.

Measles virus (MeV), rubella virus (RUBV), and parvovirus B19 (B19V) are frequent causes of exanthematic diseases (2). Although a mild rash illness is the usual clinical expression for all of these types of infection, serious secondary respiratory infections due to opportunistic pathogens are frequent during measles, as a result of the transitory immunodeficiency brought on by MeV. Other serious complications of MeV infection are postinfection acute measles encephalomyelitis (28), as well as giant cell pneumonia (20) and inclusion body encephalitis in immunodepressed patients (28). Congenital rubella syndrome is the most serious complication of the acute RUBV infections (43), although postinfection encephalopathy (18), arthropathies, and transient depression of thrombocyte counts (43) are other possible complications. Finally, nonimmune hydrops fetalis, arthropathies, and transient aplastic crisis in patients with underlying hemolytic disease (46) are the most frequent complications of B19V acute infection. The ability to establish persistent infections is well known for MeV, and this is the cause of subacute sclerosing panencephalitis (28) which has also, albeit rarely, been found to be caused by RUBV (18). Long-term arthritis and chronic anemia in immunodepressed patients (46) are the best-known clinical expressions of persistent infection by B19V, although this has been detected in bone marrow (8) and in the sinovial tissues of healthy individuals (40).

Direct diagnosis by viral isolation in cell cultures is not possible for B19V. This approach is slow and tedious and has low efficiency for MeV and RUBV diagnosis. Serological diagnosis by specific immunoglobulin M (IgM) detection is the

method of choice for all of these. Although this method provides an easy and rapid diagnosis, it has some drawbacks. False-positive reactions due to cross-reactivity are not infrequent, even with assays recommended for clinical use (14, 21, 42). The serological response is often poor in immunocompromised patients, and specific IgM is frequently absent in chronic infections (27). PCR has been shown to be an excellent tool for the direct detection of these viruses in clinical samples and, consequently, a useful complement for IgM detection for diagnostic purposes. Several individual PCR techniques have been described for each virus (3, 5, 9, 12, 13, 15–17, 23, 24, 29–31, 34, 37, 39, 41, 45).

The World Health Organization is currently attempting to reduce measles morbidity and mortality worldwide. Some regions are already planning the total eradication of the illness by the end of the first decade of this century (10, 11). An important part of these eradication plans is the surveillance of native measles in each region. This requires not only laboratory diagnosis of all cases which meet the clinical definition but also genotype characterization of the MeV strains involved in each sporadic case or outbreak, so that these may be classified as native or imported (44). Consequently, serologic diagnosis alone is not enough, and direct detection techniques able to produce viral RNA are necessary for monitoring measles eradication plans. Since rash illness caused by RUBV and B19V can be easily confused with measles virus infection, differential diagnosis is recommended for surveillance activities (4, 32), especially in the last stages of the eradication programs when no real measles cases are expected.

We describe here a new reverse transcription multiplex nested PCR (RTMNP-PCR) with internal control able to simultaneously detect and identify MeV, RUBV, and B19V in clinical samples. The usefulness of the technique for diagnosis and epidemiological surveillance is discussed.

* Corresponding author. Mailing address: Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Carretera Majadahonda-Pozuelo s/n, 28220 Majadahonda, Spain. Phone: 34-1-5097901. Fax: 34-1-5097966. E-mail: mmosquera@isciii.es.

TABLE 1. Results with clinical samples of MeV, RUBV, and B19V as determined by RTMNPOR

Viruses, group (origin), and specimen type	Total no.	No. positive ^a	No. negative	IgM result ^b	Preservation temp (°C)
MeV					
Group 1 (measles outbreak)					-70 (after several days at -4)
Pharyngeal exudates	5	5	0		
Serum	4	0	4	4 Pos	
Group 2 (neurological MeV cases)					-20 (frozen and thawed several times)
CSF	22	2	20		
Serum	11 ^c	0	11	3 Pos, 5 Neg, 3 ND	
Group 4 (vaccinated children)					-70
Pharyngeal exudates	27	0	27 ^d		
Urine samples	4	0	4		
RUBV					
Group 3 (congenital rubella syndrome)					-70 (after several days at -4°C)
Newborn pharyngeal exudate	2	2	0		
Newborn serum	3	0	3	3 Pos	
Newborn urine	3	1	2		
Mother's serum	1	0	1	1 Pos	
Group 4 (vaccinated children)					-70
Pharyngeal exudate	27	3	24 ^d		
Urine samples	4	0	4		
B19					
Group 5 (erythema infectiosum), serum	19	16	3	14 Pos	-20

^a Positive only to the specified virus and negative to the remaining ones.

^b Pos, positive; Neg, negative; ND, not done.

^c Four additional samples from this group did not show internal control band (see the text).

^d Includes one herpes simplex virus sample and one enterovirus sample.

MATERIALS AND METHODS

Virus strains. Schwarz MeV and RA27/3 RUBV vaccine strains (Beecham, Madrid, Spain), as well as a sample known to contain B19V, were used for standardization and dilution experiments. A B19V panel from the National Institute for Biological Standards and Control (Hertfordshire, United Kingdom), used for an international B19V PCR quality control (36), was used for evaluation, as well as an international MeV genotype panel (1, 44) prepared by the WHO Measles Reference Laboratory at the Centers for Disease Control (Atlanta, Ga.), including the following strains: Edmonston-wt.USA/54 (A), Chicago.USA/89/1 (D3), Palau.BLN/93 (D5), Bangkok.THA/93/1 (D5), "JM".USA/77 (C2), New Jersey.USA/94/1 (D6), Hunan.CHN/93/7 (H), Montreal.CAN/89 (D4), and Yaounde.CAE/83/14 (B1). Individual wild isolates of parainfluenza-viruses 1, 2, 3, 4A, and 4B, adenovirus 5, parotitis virus, respiratory syncytial viruses A and B, and East equine encephalitis virus (togavirus) from the Instituto de Salud Carlos III collection were used to evaluate the specificity of the assay.

Clinical samples. Results for the various groups of clinical samples are presented in Table 1. Five pharyngeal swabs and four sera from five children involved in a measles outbreak in Soria, Spain, in 1992 made up group 1. Group 2 included 22 cerebrospinal fluid (CSF) and 11 serum samples from patients suffering from measles-related encephalitis. Three urine samples, three RUBV IgM-positive sera, and two pharyngeal exudates from one newborn infant with congenital rubella syndrome, as well as one IgM-positive mother's serum, made up group 3. In this group, one urine sample, one pharyngeal exudate, and one serum sample were collected 15 days after birth, and one urine sample, one pharyngeal exudate, and one serum sample were collected 37 days after birth. The last urine and serum samples were collected 38 days after birth. Group 4 included 27 pharyngeal exudates and four urine samples from 26 vaccinated children taken between days 10 and 14 after vaccination with rubella, measles, and parotitis vaccines. Group 5 consisted of 19 serum samples (14 were B19V IgM positive, and 5 were B19V IgM negative) from 19 patients affected by an erythema infectiosum outbreak in Soria, Spain, in 1998.

Storing conditions were different for each group of samples: samples from groups 2 and 5 were frozen at -20°C, but samples from group 2 were frozen and thawed an unknown number of times for serological tests, as well as serum from groups 1 and 3. Samples, other than serum, from groups 1, 3, and 4 were stored at -70°C, but samples from group 4 were divided into aliquots and frozen

immediately upon arrival at the laboratory. Samples from groups 1 and 3, on the other hand, were kept for several days at 4°C before being frozen.

IgM detection. Rubella virus- and measles virus-specific IgM antibodies were detected by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; Dade-Behring, Berlin, Germany), while B19V-specific IgM was detected by μ -chain capture ELISA (Biotrin, Dublin, Ireland). Before being tested with indirect methods, the samples were treated with an antihuman IgG (RF Absorbens; Dade-Behring) to remove IgG in order to avoid false positives due to rheumatoid factors. All of the methods were carried out according to the manufacturer's instructions.

Isolation in cell culture. All samples were treated with a mixture of antibiotics and antifungals before inoculation into cell cultures. Urine samples were also neutralized with sodium hydroxide. Then, 200 μ l of treated sample was inoculated into each tube. Tubes were preserved with minimal essential medium (Gibco-BRL/Life Technologies, Inc.) plus gentamicin, penicillin, and streptomycin. Samples from group 4 were inoculated in both RK13 and Vero cells. Tubes were monitored for cytopathic effect (CPE) twice a week. After 10 days without CPE, both Vero and RK13 tubes were passed to fresh RK13 cells. Any tube showing CPE and all subcultures after 10 days were monitored for the presence of MeV or RUBV by using immunofluorescence with MeV (Anti-Measles; Biosoft, Paris, France)- and RUBV (Mouse Anti-rubella Monoclonal Antibody; Chemicon International, Inc., Temecula, Calif.)-specific monoclonal antibodies, followed by a final immunostaining with fluorescein-labeled anti-mouse conjugate (Anti-Mouse IgG FITC Conjugate; Sigma, St. Louis, Mo.). RK13 cell supernatants were analyzed by using PCR.

Primer design. Genomic sequences of the MeV nucleoprotein coding gene, the RUBV E1 glycoprotein gene and the B19V VP1 and VP2 capsid protein genes were obtained from genomic databases. Sequences of the same virus were aligned by using the MEGALIGN application of the DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, Wis.) package, and alignments were used for primer design (Fig. 1). Primers were synthesized by a commercial customer service (Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany).

Extraction method and specimen treatment. Genomic material was extracted from clinical samples according to a previously described protocol based on guanidinium thiocyanate extraction and further alcohol precipitation (6). As a

A. MEASLES PRIMERS

Sar1F	5'C	G	G	A	G	C	T	A	A	G	A	A	G	G	T	G	G	A	T	A	A3'	
SeqA*62	
SeqB*2		T
SeqC*1		T

Sar1R	5'C	T	C	C	C	A	T	G	G	C	A	T	A	G	C	T	C	C	A3'			
Alignm	5'T	G	G	A	G	C	T	A	T	G	C	C	A	T	G	G	A	G3'				
SeqA*64	
SeqB*1		T

Sar2F	5'C	T	A	G	A	T	T	G	C	T	G	A	A	A	T	G	A	T	A	T	G3'	
SeqA*52	
SeqB*13		T

Sar2R	5'A	A	C	T	T	G	T	T	C	T	G	A	A	T	T	G	A	G	T	T	C	T	C3'
Alignm	5'G	T
SeqA*49	
SeqB*16		A

B. RUBELLA PRIMERS

Rube1F	5'C	G	T	C	T	G	G	C	A	A	C	T	C	T	C	C	G	T3'				
SeqA*36	
SeqB*2		T
SeqC*1		.	.	G

Ru1TR	5'C	G	T	A	T	G	T	G	G	A	G	T	C	C	G	C	A	C	T	T3'		
Alignm	5'A	A	G	T	G	T	G	G	A	C	T	C	C	A	C	A	T	A	C	G3'		
SeqA*35	
SeqB*3	
SeqC*1		C	G

Rube2F	5'C	A	C	G	C	C	G	C	A	C	G	G	A	C	A	A	C	T3'				
SeqA*38	
SeqB*1		G

Rube2R	5'G	A	G	A	G	C	C	T	A	T	G	A	C	A	G	G	C	G	T	G	A3'	
Alignm	5'T	C	A	C	G	C	C	C	G	T	C	A	T	A	G	G	C	T	C	T	C3'	
SeqB*26	
SeqA*11	
SeqC*2		C

C. PARVOVIRUS B19 PRIMERS

EPV1+	5'C	A	G	A	A	G	C	C	A	G	C	A	C	T	G	G	T	G	C	A3'		
SeqA*47	
SeqB*2		T

EPV1-	5'A	T	G	G	T	G	C	A	A	A	C	C	T	T	T	G	C	C	T	C3'		
Alignm	5'G	A	G	G	C	A	A	A	G	G	T	T	T	G	C	A	C	C	A	T3'		
SeqA*43	
SeqB*5		A
SeqC*1		A	T

EPV2+	5'C	A	A	A	A	G	C	A	T	G	T	G	G	A	G	T	G	A	G	G3'		
SeqA*40	
SeqB*6		T
SeqC*1		A
SeqD*1		G
SeqE*1		M

EPV2-	5'G	T	G	C	T	C	T	G	G	T	C	A	T	A	T	G	A	A	G	A	A3'	
Alignm	5'T	T	C	C	A	T	A	T	G	A	C	C	C	A	G	A	G	C	A	C3'		
SeqA*39	
SeqB*5		T
SeqC*2	
SeqD*1	
SeqE*1	
SeqF*1		G

FIG. 1. Primers. (A) Measles primers. Sar1F and Sar1R are first-reaction primers. Sar2F and Sar2R are second-reaction primers. Both the band size of each pair of primers and the position of each primer following sequence K01711 (Edmonston strain) are given. (B) Rubella primers. Rube1F and Ru1TR are first-reaction primers. Rube2F and Rube 2R are second-reaction primers. Both the band size of each pair of primers and the position of each primer following sequence M15240 (Therien strain) are given. (C) Parvovirus B19 primers. EPV1+ and EPV1- are first-reaction primers. EPV2+ and EPV2- are second-reaction primers. Both the band size of each pair of primers and the position of each primer following sequence N000883 (Gallinella, unpublished) are given. Accession numbers of the sequences used in the alignments and other pertinent data are given below for each virus. For the upper sequences of panel A, the band size was 443 bp (primer Sar1F is between positions 680 and 700 and primer Sar1R is between positions 1105 and 1123). For the lower sequences of panel A, the band size was 229 bp (primer Sar 2F is between positions 851 and 872 and primer Sar2R is between positions 1057 and 1079; position following sequence K01711 (Edmonston strain), Cattaneo 1989). The accession numbers of the sequences in the alignment were as follows: AF045205, AF045206, AF045207, AF045208, AF045209, AF045210, AF045211, AF045212, AF045213, AF045214, AF045215, AF045216, AF045217, AF045218, D63925, D63927, E04903, K01711, L46728, L46730, L46740, L46744, L46733, L46746, L46748, L46750, L46753, L46756, L46760, L46764, L46758, M89921, M89922, S58435, U01974, U01976, U01977, U01978, U01987, U01988, U01989, U01990, U01991, U01992, U01993, U01994, U01995, U01996, U01998, U01999, U03650, U03653, U03656, U03658, U03661, U03664, U03668, U29317, X01999, X13480, X16566, X16567, X16568, X16569, Z66517. For the upper sequences of panel B, the band size was 380 bp (primer Rube1F is between positions 8745 and 8762 and primer Ru1TR is between positions 9106 and 9125). For the lower sequence of panel B, the band size was 289 (primer Rube2F is between positions 8808 and 8825 and primer Rube2R is between positions 9077 and 9097; position following sequence M15240, Therien strain, Frey 1986). The accession numbers were as follows: AB003337, AB003338, AB003339, AB003340, AB003341, AB003342, AB003343, AB003344, AB003345, AB003346, AB003347, AB003348, AB003349, AB003350, AB003351, AB003352, AB003355, D00156, D50673, D50674, D50675, D50676, D50677, L16228, L16229, L16230, L16231, L16232, L16233, L16234, L16235, L16236, L78917, L19420, L19421, M15240, M30776, X05259, X14871. For the upper sequences of panel C, the band size was 211 bp (primer EPV1+ is between positions 3323 and 3342 and primers EPV1- is between positions 3514 and 3533) For the lower sequences of panel C, the band size was 94 bp (primer EPV2+ is between positions 3366 and 3385 and primer EPV2- is between positions 3440 and 3459; position following complete sequence of strain HV, N000883, Gallinella [unpublished]). The accession numbers were as follows: AB015949, AB015950, AB015951, AB015952, AB015953, AB015959, AB030673, AB030693, AB030694, AF113323, AF161223, AF161224, AF161225, AF161226, AF161228, AF162273, AF221904, AF221905, AF264149, N000883, M13178, U31358, U38506, U38507, U38508, U38509, U38510, U38511, U38512, U38513, U38514, U38515, U38516, U38517, U38518, U38546, U53593, U53594, U53595, U53596, U53597, U53598, U53599, U53600, U53601, Z68146, Z70528, Z70560, Z70599.

part of the internal control system, 500 molecules of a previously described plasmid (7) per ml were also included in the lysis buffer.

RT and amplification. A coupled RT-amplification reaction was performed by using the Access RT-PCR System kit (Promega, Madison, Wis.). A total of 5 µl of extract was added to a PCR mixture covered with mineral oil containing 3 mM MgSO₄; 500 µM concentrations of dATP, dGTP, dCTP, and dTTP; 0.5 µM

concentrations of measles virus-, rubella virus-, and parvovirus B19-specific primary reaction primers (Fig. 1); 10 µl of AMV/Th 5× reaction buffer; 5 U of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase; and 5 U of *Thermus flavus* DNA polymerase to a final volume of 50 µl. A pair of primers specific for the internal control plasmid (7) was also included to a final concentration of 0.2 µM in each case. Tubes were placed in an Autocycler Plus Thermocycler (Linus; Cultiect S.L.)

programmed as follows: 45 min at 48°C for RT and 2 min at 94°C for reverse transcriptase inactivation and cDNA denaturation, followed by 30 cycles of 1 min of denaturation at 93°C, 1 min of annealing at 50°C, and 1 min of elongation at 72°C. Elongation was extended to 5 min in the last cycle.

For the nested reaction, 1 μ l of the primary amplification products was added to 49 μ l of a new PCR mixture containing 4 mM MgCl₂; 500 μ M concentrations of dATP, dGTP, dCTP, and dTTP; a 0.2 μ M concentration of nested instead of primary reaction primers (Fig. 1); a 0.2 μ M concentration of internal control-specific nested reaction primers (7), 5 μ l of 10 \times PCR buffer II (Roche Molecular Systems, Inc.), and 0.25 U of *Taq* DNA polymerase (Amplitaq DNA Polymerase; Roche Molecular Systems). The thermal program consisted of a first cycle of 2 min at 94°C, followed by 30 cycles of 1 min of denaturation at 94°C, 1 min of annealing at 55°C, and 1 min of elongation at 72°C. Elongation was extended to 5 min in the last cycle. MgCl₂, deoxynucleoside triphosphate, and primer concentrations were selected for both primary and nested amplifications as a result of standardization experiments, as well as hybridization and denaturation temperatures.

PCR products were visualized and sized by gel electrophoresis in 2% agarose containing 0.5 μ g of ethidium bromide per ml in Tris-borate-EDTA buffer and were visualized under UV light. Expected band sizes were 289 bp for RUBV, 229 bp for MeV, and 94 bp for B19V. Positive samples showed the specific RUBV, MeV, or B19V band and the 140-bp internal control band. When only the internal control band appeared, samples were considered negative. Samples that showed no band were retested, and those that lacked any band after repeat testing were assumed to contain enzyme inhibitors.

Standard precautions were taken to avoid carryover contamination. Pipetting was performed with aerosol-resistant tips, and different biosafety cabinets were used for sample extraction and first amplification or nested amplification. Amplicon detection was performed in a different room.

PCR product cloning. Primary amplification products from vaccine strains of measles virus and rubella virus, as well as from the laboratory strain of parvovirus B19, were purified by using the GeneClean II kit and were ligated into pGEM-T plasmid vectors with the pGEM-T plasmid vector system (Promega) according to the manufacturer's directions. Plasmids were transformed into high-efficiency competent cells (Epicurian coli SL1-Blue; Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Calif.) by electroporation. Transformants were selected in Luria broth-ampicillin-IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside-X-Gal) (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) plates, and the presence of the expected insert was confirmed by PCR. Plasmids were purified with the Wizard Plus SV Minipreps kit (Promega). The number of plasmid copies in the final suspensions was estimated by UV spectroscopy at an optical density of 260 nm.

RESULTS

Sensitivity and specificity. DNA bands of the expected size were obtained for all MeV, RUBV, and B19V viruses (Fig. 2), and no cross-amplification was observed with the other viruses. Serial 10-fold dilution experiments made with vaccine strains comparing PCR with RUBV isolation in RK13 cells, and MeV in B95 cells showed sensitivity rates of 0.04 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀) for RUBV and 0.004 TCID₅₀ for MeV.

In dilution experiments made with plasmids containing inserts of the primary reaction amplification products, PCR was able to detect as few as 10 molecules for MeV and RUBV and 1 molecule for B19V.

Clinical specimens. All five pharyngeal exudates from measles patients were MeV positive, whereas all four serum samples were negative in group 1 (Table 1). MeV RNA was detected in 2 of 22 CSF samples from group 2, but no amplification was obtained with any of the 11 sera. Two pharyngeal exudates taken 15 and 37 days after birth and one urine taken 37 days after birth from the case of congenital rubella syndrome (group 3) showed the presence of RUBV RNA. As in the case of MeV, no amplification was obtained with any serum. RUBV was detected in three pharyngeal exudates of 27 postvaccinated children from group 4. One of them was posi-

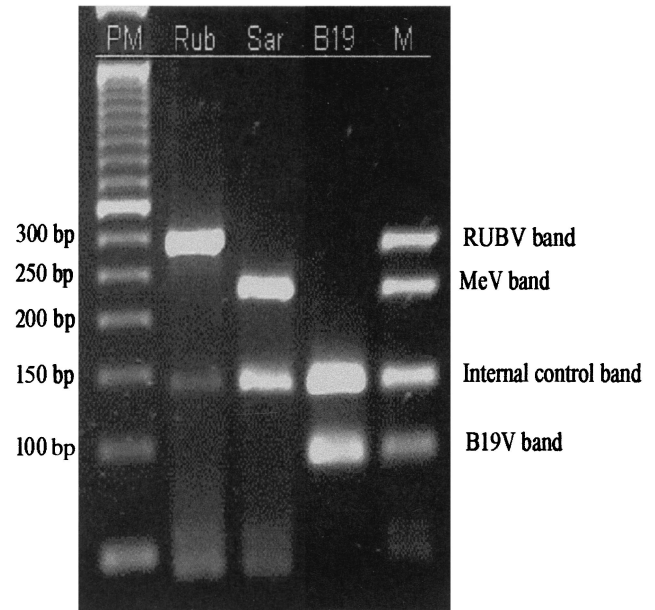


FIG. 2. RT-PCR results on gel. Lanes: PM, 50-bp DNA ladder (Gibco-BRL); Rub, RUBV; Sar, MeV; B19, B19V; M, homemade molecular weight with a mix of RUBV, MeV, and B19V amplification products.

tive by culture, another was negative, and the third could not be cultured due to contamination. All children were negative for MeV. Finally, B19V DNA was detected in 16 of 19 sera from patients with erythema infectiosum (group 5); 14 of these 19 sera were positive for parvovirus B19 IgM, 1 was undetermined, and 4 were IgM negative.

Four sera from group 1 and four sera from group 2 lacked of internal control band in PCR screening. All four sera from group 1 were negative on repetition, three sera from group 2 could not be tested again, while the remaining one did not show internal control band on repetition and, consequently, the presence of inhibitors was suspected. These last four samples were not considered for analysis and are not shown in Table 1.

DISCUSSION

The multiplex PCR described here has been shown to be able to detect RNA from MeV and RUBV, as well as DNA from B19V in one single reaction. Although several studies describing individual PCR methods can be found for each virus (3, 9, 12, 13, 15, 16, 19, 22–25, 30, 31, 33, 37–39, 41, 45), no one has been able to detect all of these simultaneously. Nested PCR has allowed us to achieve very high sensitivity versus virus isolation in cell cultures, as well as in cDNA plasmid dilution experiments. Sensitivity is critical for diagnosis, especially for certain samples that usually contain small amounts of virus, as is the case of spinal fluid. The high sensitivity showed in these experiments correlated with the results obtained for pharyngeal exudates from a measles outbreak, as well as with pharyngeal exudates and urine samples from a congenital rubella case and serum samples from an erythema infectiosum outbreak. All of these results concur with previous studies (3, 9,

13, 19, 22–25, 30, 31, 33, 37–39, 41, 45). The recovery rates of RV in pharyngeal samples after vaccination with attenuated virus was poor but were similar to those previously observed in other studies (3). However, our viral detection rate for serum samples from measles and rubella cases, as well as for spinal fluids from MeV-related neurological diseases, was lower than expected compared to some published data (26, 29, 30). Nevertheless, another work concludes that MeV RNA amplification from sera is infrequent, especially after the first week of symptoms (35). RNA degradation due to improper storage could also account for these poor results, since all of these serum samples were stored at -20°C for many years and were frozen and thawed an unknown number of times. In contrast, the PCR-positive pharyngeal exudates and urine samples from these same cases were stored at -70°C and remained frozen until PCR testing. However, Kreis and Schoub (26) obtained three positive results in 14 sera with similar characteristics. Further analysis with fresh samples is required to establish the ability of the technique described here to detect MeV and RUBV in serum and spinal fluid.

Since the target plasmid for the internal control system used here was included in the lysis buffer, this must be carried out during the whole extraction procedure, enabling detection of handling errors. This is very important, since pellets are frequently not apparent and could be easily discarded with the supernatants in precipitation steps. Moreover, the use of a limited number of plasmid molecules makes it possible to monitor the presence of any factor affecting the sensitivity of the reaction in any individual tube. Consequently, the possibility of false negatives is significantly reduced by the use of this internal control system.

In conclusion, the multiplex PCR method described here is useful for the diagnosis of viral exanthematic diseases as a complement of IgM detection, which remains the method of choice for these three viruses. Nevertheless, RTMNP-PCR is especially indicated for monitoring measles eradication plans, since it enables not only detection of samples with available measles RNA for genotyping but also provides differential diagnosis for the most common exanthematic viruses, without any additional cost. Since most countries are using a combined vaccine for rubella, measles, and mumps, rubella prevalence is expected to be dramatically decreased along with measles eradication. Consequently, additional studies are needed to establish the best composition of multiplex PCR methods for the diagnosis of viral exanthemes in the future.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was undertaken at the Instituto de Salud Carlos III, partly during a stay by the first author, who belonged to the staff of the Microbiology Unit of the Nuestra Señora del Pino Hospital in Las Palmas (Gran Canaria, Canary Islands). The study also received financial support from a fellowship from the Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

REFERENCES

- Bellini, W. J., and P. A. Rota. 1998. Genetic diversity of wild-type measles viruses: implications for global measles elimination programs. *Emerg. Infect. Dis.* **4**:29–35.
- Bologna, J., and I. M. Braverman. 1994. Skin manifestations of internal disease, p. 300. *In* K. J. Isselbacher, E. Braunwald, J. D. Wilson, J. B. Martin, A. S. Fauci, and D. L. Kasper (ed.), *Principles of internal medicine*, 13th ed., vol. 1. McGraw-Hill Book Company, New York, NY.
- Bosma, T. J., K. M. Corbett, S. O'Shea, J. E. Banatvala, and J. M. Best. 1995. PCR for detection of rubella virus RNA in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* **33**:1075–1079.
- Carlson, J., H. Artsob, M. Douville-Fradet, P. Duclos, M. Fearon, S. Ratnam, G. Tipples, P. Varughese, B. Ward, and J. Sciberras. 1998. Measles surveillance: guidelines for laboratory support. Working Group on Measles Elimination. *Can. Commun. Dis. Rep.* **24**:33–44.
- Carriere, C., P. Boulanger, and C. Delsert. 1993. Rapid and sensitive method for the detection of B19 virus DNA using the polymerase chain reaction with nested primers. *J. Virol. Methods* **44**:221–234.
- Casas, I., L. Powell, P. E. Klapper, and G. M. Cleator. 1995. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Methods* **53**:25–36.
- Casas, I., A. Tenorio, J. M. Echevarria, P. E. Klapper, and G. M. Cleator. 1997. Detection of enteroviral RNA and specific DNA of herpesviruses by multiplex genome amplification. *J. Virol. Methods* **66**:39–50.
- Cassinotti, P., G. Burtonboy, M. Fopp, and G. Siegl. 1997. Evidence for persistence of human parvovirus B19 DNA in bone marrow. *J. Med. Virol.* **53**:229–232.
- Cassinotti, P., M. Weitz, and G. Siegl. 1993. Human parvovirus B19 infections: routine diagnosis by a new nested polymerase chain reaction assay. *J. Med. Virol.* **40**:228–234.
- Centers for Disease Control. 1998. Advances in global measles control and elimination: summary of the 1997 international meeting. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **47**:1–23.
- Centers for Disease Control. 1999. Global measles control and regional elimination, 1998–1999. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **48**:1124–1130.
- Chadwick, N., I. Bruce, M. Davies, B. van Gemen, R. Schukink, K. Khan, R. Pounder, and A. Wakefield. 1998. A sensitive and robust method for measles RNA detection. *J. Virol. Methods* **70**:59–70.
- Clewley, J. P. 1989. Polymerase chain reaction assay of parvovirus B19 DNA in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **27**:2647–2651.
- de Ory, F., M. E. Guisasaola, A. Téllez, and C. E. Domingo. 1996. Comparative evaluation of commercial methods for the detection of parvovirus B19-specific immunoglobulin M. *Serodiagn. Immunother. Infect. Dis.* **8**:117–120.
- Durigon, E. L., D. D. Erdman, G. W. Gary, M. A. Pallansch, T. J. Torok, and L. J. Anderson. 1993. Multiple primer pairs for polymerase chain reaction (PCR) amplification of human parvovirus B19 DNA. *J. Virol. Methods* **44**:155–165.
- Eggerding, F. A., J. Peters, R. K. Lee, and C. B. Inderlied. 1991. Detection of rubella virus gene sequences by enzymatic amplification and direct sequencing of amplified DNA. *J. Clin. Microbiol.* **29**:945–952.
- Erdman, D. D., E. L. Durigon, and B. P. Holloway. 1994. Detection of human parvovirus B19 DNA PCR products by RNA probe hybridization enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* **32**:2295–2298.
- Frey, T. K. 1997. Neurological aspects of rubella virus infection. *Intervirology* **40**:167–175.
- Fridell, E., A. N. Bekassy, B. Larsson, and B. M. Eriksson. 1992. Polymerase chain reaction with double primer pairs for detection of human parvovirus B19 induced aplastic crises in family outbreaks. *Scand. J. Infect. Dis.* **24**:275–282.
- Griffin, D. E., and W. J. Bellini. 1996. Measles virus, p. 1267–1312. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 3rd ed., vol. 1. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.
- Helfand, R. F., J. L. Heath, L. J. Anderson, E. F. Maes, D. Guris, and W. J. Bellini. 1997. Diagnosis of measles with an IgM capture EIA: the optimal timing of specimen collection after rash onset. *J. Infect. Dis.* **175**:195–199.
- Hornsleth, A., K. M. Carlsen, L. S. Christensen, M. Gundestrup, E. D. Heegaard, and J. Myhre. 1994. Estimation of serum concentration of parvovirus B19 DNA by PCR in patients with chronic anaemia. *Res. Virol.* **145**:379–386.
- Ho-Terry, L., G. M. Terry, and P. Londesborough. 1990. Diagnosis of foetal rubella virus infection by polymerase chain reaction. *J. Gen. Virol.* **71**:1607–1611.
- Koch, W. C., and S. P. Adler. 1990. Detection of human parvovirus B19 DNA by using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **28**:65–69.
- Kovacs, B. W., D. E. Carlson, B. Shahbahrami, and L. D. Platt. 1992. Prenatal diagnosis of human parvovirus B19 in nonimmune hydrops fetalis by polymerase chain reaction. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **167**:461–466.
- Kreis, S., and B. D. Schoub. 1998. Partial amplification of the measles virus nucleocapsid gene from stored sera and cerebrospinal fluids for molecular epidemiological studies. *J. Med. Virol.* **56**:174–177.
- Kurtzman, G. J., B. J. Cohen, A. M. Field, R. Oseas, R. M. Blaese, and N. S. Young. 1989. Immune response to B19 parvovirus and an antibody defect in persistent viral infection. *J. Clin. Investig.* **84**:1114–1123.
- Liebert, U. G. 1997. Measles virus infections of the central nervous system. *Intervirology* **40**:176–184.
- Matsuzono, Y., M. Narita, N. Ishiguro, and T. Togashi. 1994. Detection of measles virus from clinical samples using the polymerase chain reaction. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* **148**:289–293.
- Nakayama, T., T. Mori, S. Yamaguchi, S. Sonoda, S. Asamura, R. Yamashita, Y. Takeuchi, and T. Urano. 1995. Detection of measles virus ge-

- nome directly from clinical samples by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and genetic variability. *Virus Res.* **35**:1–16.
31. **Patou, G., D. Pillay, S. Myint, and J. Pattison.** 1993. Characterization of a nested polymerase chain reaction assay for detection of parvovirus B19. *J. Clin. Microbiol.* **31**:540–546.
 32. **Ramsay, M.** 1997. Strategic plan for the elimination of measles in the European Region. Seventh meeting of national programme managers. World Health Organization, Berlin, Germany.
 33. **Revello, M. G., F. Baldanti, A. Sarasini, M. Zavattoni, M. Torsellini, and G. Gerna.** 1997. Prenatal diagnosis of rubella virus infection by direct detection and semiquantitation of viral RNA in clinical samples by reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* **35**:708–713.
 34. **Revello, M. G., A. Sarasini, F. Baldanti, E. Percivalle, D. Zella, and G. Gerna.** 1997. Use of reverse-transcription polymerase chain reaction for detection of rubella virus RNA in cell cultures inoculated with clinical samples. *New Microbiol.* **20**:197–206.
 35. **Riddell, M. A., D. Chibo, H. A. Kelly, M. G. Catton, and C. J. Birch.** 2001. Investigation of optimal specimen type and sampling time for detection of measles virus RNA during a measles epidemic. *J. Clin. Microbiol.* **39**:375–376.
 36. **Saldanha, J., and P. Minor.** 1997. Collaborative study to assess the suitability of a proposed working reagent for human parvovirus B19 DNA detection in plasma pools by gene amplification techniques. B19 Collaborative Study Group. *Vox Sang.* **73**:207–211.
 37. **Schwarz, T. F., G. Jager, W. Holzgreve, and M. Roggendorf.** 1992. Diagnosis of human parvovirus B19 infections by polymerase chain reaction. *Scand. J. Infect. Dis.* **24**:691–696.
 38. **Sevall, J. S.** 1990. Detection of parvovirus B19 by dot-blot and polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes* **4**:237–246.
 39. **Shimizu, H., C. A. McCarthy, M. F. Smaron, and J. C. Burns.** 1993. Polymerase chain reaction for detection of measles virus in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* **31**:1034–1039.
 40. **Soderlund, M., R. von Essen, J. Haapasaari, U. Kiistala, O. Kiviluoto, and K. Hedman.** 1997. Persistence of parvovirus B19 DNA in synovial membranes of young patients with and without chronic arthropathy. *Lancet* **349**:1063–1065.
 41. **Tanemura, M., K. Suzumori, Y. Yagami, and S. Katow.** 1996. Diagnosis of foetal rubella infection with reverse transcription and nested polymerase chain reaction: a study of 34 cases diagnosed in fetuses. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **174**:578–582.
 42. **Thomas, H. I., E. Barrett, L. M. Hesketh, A. Wynne, and P. Morgan-Capner.** 1999. Simultaneous IgM reactivity by EIA against more than one virus in measles, parvovirus B19 and rubella infection. *J. Clin. Virol.* **14**:107–118.
 43. **Wolinsky, J. S.** 1996. Rubella, p. 899–929. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 3rd ed., vol. 1. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.
 44. **World Health Organization.** 1998. Expanded Programme on Immunisation (EPI). Standardisation of the nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses. *Wkly. Epidemiol. Rec.* **73**:265–269.
 45. **Yamakawa, Y., H. Oka, S. Hori, T. Arai, and R. Izumi.** 1995. Detection of human parvovirus B19 DNA by nested polymerase chain reaction. *Obstet. Gynecol.* **86**:126–129.
 46. **Young, N. S.** 1996. Parvoviruses, p. 2199–2220. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 3rd ed., vol. 1. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.

Short communication

Use of whole blood dried on filter paper for detection and genotyping of measles virus

María del Mar Mosquera^{a,*}, Juan E. Echevarría^a,
Sabino Puente^c, Félix Lahulla^b, Fernando de Ory^a

^a Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Carretera de Majadahonda-Pozuelo s/n, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain

^b Hospital Regional de Bata, Bata, Equatorial Guinea

^c Hospital Carlos III, Madrid, Spain

Received 19 August 2003; received in revised form 8 December 2003; accepted 9 December 2003

Abstract

PCR, and two different ELISAs were used to detect measles virus on blood dried on filter paper samples from Equatorial Guinea. Sensitivity was 40% by PCR, 57.1% by indirect ELISA and 86.7% by μ chain capture ELISA. Genotype B3 was found in two positive samples by PCR. © 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Measles; Polymerase chain reaction; Genotyping; Blood dried on filter paper

Laboratory diagnosis of measles virus infection is usually done by detection of specific IgM in serum samples. Recently, the use of blood samples dried in filter paper have been described as a potential good alternative, useful both for specific IgM (De Swart et al., 2001; Helfand et al., 2001; Riddell et al., 2002), and PCR (De Swart et al., 2001; Katz et al., 2002) for situations when serum cannot be easily obtained and stored. However, these studies were made under well controlled laboratory conditions. The present study shows results on samples obtained in a tropical area without adequate conditions for serum extraction and storing. Two commercial kits were used for the detection of measles virus specific IgM based either on indirect (Dade Behring, Germany) or μ chain capture (Chemicon USA) ELISA, and a multiplex nested reverse transcription PCR (RTMNP-PCR), designed for simultaneous detection of measles virus, rubella virus and parvovirus B19 (Mosquera Mdel et al., 2002), with the aim of diagnosing measles virus on dried blood samples. Genotyping measles virus was attempted on positive samples by sequencing a fragment of 456 bp corresponding to the COOH terminus on the nucleoprotein coding region amplified previously by

a different reverse transcription nested PCR, currently under evaluation. Sequences were obtained with an automatic sequencer and compared with reference strains of measles virus genotypes. For this purpose, phylogenetic distance analysis of the aligned sequences was undertaken by the neighbor-joining algorithm as unrooted tree tested with 1000 bootstraps using the MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Tempe, Arizona, USA) software.

Twenty samples were taken from 19 patients (age: 3 months–7.5 years) from a measles outbreak occurred in Equatorial Guinea from February to May of 2001. The specimens were taken during the first 3 days after the exanthema. The samples were collected at the Hospital Regional de Bata in a period of 4 weeks on May and maintained at room temperature (22–30 °C with a relative humidity of 90%) until they were sent to the laboratory in Spain. Finally, they were stored at 4 °C until tested, no more than 2 months later. All samples were tested by RTMNP-PCR, 14 by indirect ELISA, and 15 by μ chain capture ELISA.

One circular filter paper piece of 3 mm in diameter corresponded to 1 μ l of serum (Evengard et al., 1988). In each serological assay, the adequate volume of dilution buffer was used to reach the corresponding dilution (1:40 in indirect ELISA and 1:200 in the capture assay). Serological tests were carried out according to manufacturer's instructions. Both tests included antigen and control antigen wells each

* Corresponding author. Tel.: +34-1-5097901; fax: +34-1-5097966.
E-mail address: mmosquera@isciii.es (M.d.M. Mosquera).

Table 1
Results of IgM and PCR on blood dried on filter paper

No. of specimen	Age	PCR SAR	EIA SAR IND	EIA SAR CAP
1	21 months	Positive	Equivocal	Positive
2	3 months	Positive	Positive	Positive
3	UN	Negative	Negative	Negative
4	3 years	Negative	Positive	Positive
5	UN	Positive	Equivocal	Positive
6	5 years	Negative	NIR	Equivocal
7	6 years	Positive	NT	NT
8	UN	Negative	NT	NT
9	8 months	Negative	NT	NT
10	UN	Negative	Equivocal	Equivocal
11	UN	Negative	NT	NT
12	7.5 years	Positive	Negative	Positive
13	14 months	Negative	Positive	Positive
14	5 years	Positive	NT	NT
15	4 months	Negative	Positive	Positive
16 ^a	1 years	Negative	NIR	Positive
17 ^b	7 years	Positive	Negative	Positive
18 ^b	7 years	Negative	Negative	Positive
19	9 months	Positive	Equivocal	Positive
20	6 months	Negative	NT	Negative
Positives/ total (%)		8/20 (40%)	8/14 (57.1%)	13/14 (86.7%)

NIR: non-interpretable result; UN: unknown; NT: not tested; PCR SAR: RTMNPCR; EIA SAR IND: indirect IgM measles ELISA; EIA SAR CAP: μ chain capture IgM measles ELISA.

^a Patient B19V positive.

^b Samples from the same patient.

sample. In the indirect ELISA sera showing absorbance values higher than 0.20 were considered positive, equivocal if the absorbance ranged between 0.10 and 0.20, and negative if the absorbance was lower than 0.10. In the capture assay, the cut-off was established as the “absorbance of negative control \times 3”. Samples with absorbance values higher than the cut-off were positive, equivocal if the absorbance was between the cut-off and cut-off \times 0.8, and negative if the absorbance was lower than cut-off \times 0.8. RTMNPCR were carried out with one dried spot, first allowing the filter paper to soak in 500 μ l of RNase-free water for 15 min, then extracting 100 μ l of the blood soaked water as previously described (Casas et al., 1995).

The results are shown in Table 1. By the indirect ELISA, four samples were positive, four equivocal, and four negative; the remaining two samples were non-interpretable, since high absorbance values were obtained in the control antigen wells. Both positive and equivocal results indicates recent infection with measles virus (de Ory, 2001; Riddell et al., 2002), thus the sensitivity of indirect ELISA was 57.1%. In relation to the capture assay, 11 samples were positive, 2 equivocal, and 2 negative; the sensitivity was 86.7%. Finally, measles virus RNA was detected in 40% of the samples, what is in agreement with the sensitivity obtained in a previous report (De Swart et al., 2001).

B19 viral DNA was detected in one sample (case 16, Table 1), positive for measles virus IgM in the capture assay.

However, this sample was negative when tested for B19 specific IgM by a μ chain capture ELISA (Biotrin, Ireland). The patient suffered from *Plasmodium falciparum* infection, and died some days later.

Sequencing of the 456 bp fragment containing the variable region of the N gene showed genotype B3 on samples no. 7 and 19, which is one of the genotypes found in this geographical area (Hanses et al., 1999; Koumou et al., 2002; Mulders et al., 2001; Truong et al., 1999).

The capture assay used in this study has been reported as highly sensitive, being able to detect positive results in early samples (de Ory, 2001; Ratnam et al., 2000). However, some problems of specificity have been detected due to false positive results on samples positive for other exanthematic diseases, as rubella, B19 or dengue (de Ory, 2001). This could be the cause of the result obtained by the capture assay on that sample positive for B19 by RTMNPCR. Despite the indirect ELISA being reported previously as sensitive and specific both for sera (de Ory, 2001; Ratnam et al., 2000), and dried blood samples (Helfand et al., 2001; Riddell et al., 2002) it seems to lack of sensitivity. Since high optical density (OD) values were obtained in the control antigen well, causing a non-interpretable or negative results in positive RTMNPCR cases, blood residues in the eluate could act as interfering factors in the indirect ELISA. The use of alternative elution procedures could have avoided this problem (Riddell et al., 2002), but this study was not still available by the time of sample processing. Other factors such as early sampling or bad storing conditions could also account for this problem.

RTMNPCR and indirect ELISA seemed to be complementary for diagnosis, since two RTMNPCR positive results were obtained in negative ELISA samples, while four RTMNPCR negative samples were positive or equivocal by indirect ELISA.

In summary, dried blood samples are useful for the diagnosis of measles virus infection by serological and PCR approaches, allowing to get the viral genotype by direct sequencing. As sampling of blood on filter paper does not need venipuncture and further refrigeration, this simple technique could be useful for the surveillance of measles activity as an alternative of venipuncture in remote areas in developing countries or in patients refusing venipuncture.

Acknowledgements

This study was funded by the Dirección General de Salud Pública and the Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Sanidad y Consumo) under the project “Development of the measles elimination program in Spain” (project number: SBVI 1284-3/02). The authors thank the collaboration of the technicians Teodora Minguito and Pilar Balfagón and the Biopolimers Unit of the National Centre of Microbiology (Instituto de Salud Carlos III).

References

- Casas, I., Powell, L., Klapper, P.E., Cleator, G.M., 1995. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Methods* 53 (1), 25–36.
- de Ory, F., 2001. Evaluation of a capture enzyme-immunoassay (ELISA) for the diagnosis of measles virus infection. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.* 19 (8), 409–411.
- De Swart, R.L., Nur, Y., Abdallah, A., Kruining, H., El Mubarak, H.S., Ibrahim, S.A., Van Den Hoogen, B., Groen, J., Osterhaus, A.D., 2001. 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.* 39 (1), 270–273.
- Evengard, B., Linder, E., Lundbergh, P., 1988. Standardization of a filter-paper technique for blood sampling. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 82 (3), 295–303.
- Hanses, F., Truong, A.T., Ammerlaan, W., Ikusika, O., Adu, F., Oyefolu, A.O., Omilabu, S.A., Muller, C.P., 1999. Molecular epidemiology of Nigerian and Ghanaian measles virus isolates reveals a genotype circulating widely in western and central Africa. *J. Gen. Virol.* 80 (Pt 4), 871–877.
- Helfand, R.F., Keyserling, H.L., Williams, I., Murray, A., Mei, J., Moscattello, C., Icenogle, J., Bellini, W.J., 2001. Comparative detection of measles and rubella IgM and IgG derived from filter paper blood and serum samples. *J. Med. Virol.* 65 (4), 751–757.
- Katz, R.S., Premenko-Lanier, M., McChesney, M.B., Rota, P.A., Bellini, W.J., 2002. Detection of measles virus RNA in whole blood stored on filter paper. *J. Med. Virol.* 67 (4), 596–602.
- Kouomou, D.W., Nerrienet, E., Mfoupouendoun, J., Tene, G., Whittle, H., Wild, T.F., 2002. Measles virus strains circulating in Central and West Africa: geographical distribution of two B3 genotypes. *J. Med. Virol.* 68 (3), 433–440.
- Mosquera Mdel, M., de Ory, F., Moreno, M., Echevarria, J.E., 2002. Simultaneous detection of measles virus, rubella virus, and parvovirus B19 by using multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40 (1), 111–116.
- Mulders, M.N., Truong, A.T., Muller, C.P., 2001. Monitoring of measles elimination using molecular epidemiology. *Vaccine* 19 (17–19), 2245–2249.
- Ratnam, S., Tipples, G., Head, C., Fauvel, M., Fearon, M., Ward, B.J., 2000. Performance of indirect immunoglobulin M (IgM) serology tests and IgM capture assays for laboratory diagnosis of measles. *J. Clin. Microbiol.* 38 (1), 99–104.
- Riddell, M.A., Leydon, J.A., Catton, M.G., Kelly, H.A., 2002. Detection of measles virus-specific immunoglobulin M in dried venous blood samples by using a commercial enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 40 (1), 5–9.
- Truong, A.T., Kreis, S., Ammerlaan, W., Hartter, H.K., Adu, F., Omilabu, S.A., Oyefolu, A.O., Berbers, G.A., Muller, C.P., 1999. Genotypic and antigenic characterization of hemagglutinin proteins of African measles virus isolates. *Virus Res.* 62 (1), 89–95.

Measles Virus Genotype Circulation in Spain After Implementation of the National Measles Elimination Plan 2001–2003

María Mar Mosquera,* Fernando de Ory, Juan Emilio Echevarría, and The Network of Laboratories in the Spanish National Measles Elimination Plan

Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Molecular characterization of measles virus is important for disease surveillance and for monitoring elimination of the virus throughout the world. Furthermore, knowledge of genotype distribution in as many countries as possible, is useful for tracing the origin of a strain, especially in countries without endemic measles disease, where most cases are imported. Data on genotypes circulating in Spain from 1970 to 1997 showed the prevalence of genotypes C1, C2, and D6, with subsequent replacement of each other. After the establishment of the Spanish Measles Elimination Plan, genotyping with a new reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was undertaken directly on 92 specimens, corresponding to 90 patients, which were positive for measles by a different diagnostic RT-PCR. Genotypes B3, D4, D8, A, C2, H1, and D7 were found in different autonomous communities (Madrid, Balearic Islands, Valencia Community, Extremadura, Andalusia, Canary Islands and Murcia) between 2001 and 2003 with none of these genotypes being prevalent. After the introduction of the vaccine in 1978, the incidence of the disease decreased from 150,000 cases in 1977 to 64 in 2002. This could be the reason for the change observed in the pattern of measles genotype circulation, since this pattern was reported in countries at an advanced stage of eradication of measles. This report considers that Spain is on the way to eradicating measles. *J. Med. Virol.* 75:137–146, 2005. © 2005 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: RT-PCR; molecular epidemiology; genotyping; phylogeny; sequence analysis; RNA

INTRODUCTION

Measles virus is known as a monotypic virus serologically; nevertheless it is sufficiently variable to distinguish eight clades, designated A–H, which include 22

recognized genotypes (A, B1–B3, C1, C2, D1–D9, E, F, G1–G3, H1, and H2) [WHO, 2003]. One of the requirements for defining a genotype is a minimum nucleotide sequence divergence of 2.5% in the 3' terminus of the nucleoprotein gene, and 2.0% in the entire hemagglutinin. Another factor necessary for acceptance of a new genotype is its epidemiological utility, as in the case of D9 and G3 [WHO, 2003]. Some of these genotypes are restricted specifically to certain countries or areas, for instance H1 in China, the Republic of Korea and Japan, or B3 in West and Central Africa [Hanses et al., 1999; WHO, 2001, 2003; Rota and Bellini, 2003; Zhou et al., 2003].

Molecular characterization of measles virus is important, not only for disease surveillance but also in order to monitor circulation and eradication of the virus throughout the world. Hence, knowledge of genotype distribution in as many countries as possible is extremely useful for tracing the origin of any detected strain, especially in countries with an advanced eradication program, where most cases are imported.

According to the Strategic Plan for the Elimination of Measles in the European Region [WHO, 1999], the estimated proportion of the population susceptible to measles virus should be reduced to low levels by the year

Institution at which the work was performed: Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

Members of the Network of Laboratories in the Spanish National Measles Elimination Plan: Beatriz Acosta (Valencia), Rebeca Benarroch (Ceuta), Loreto Cuenca (Epidemiology, Almería), Virtudes Gallardo (Epidemiology, Sevilla), Paloma Martín (Badajoz), Ana Martínez (Oviedo), María Carmen Pérez (Las Palmas de Gran Canaria), Joaquín Plazas (Alicante), Bibiana Puente (Epidemiology, Toledo), Jordi Reina (Palma de Mallorca), María Jesús Rodríguez (Epidemiology, Valladolid), Joaquín Ruiz (Murcia), Carlos Salas (Lienres), Juan Carlos Sanz (Madrid).

*Correspondence to: María Mar Mosquera, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Carretera de Majadahonda-Pozuelo s/n, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain. E-mail: mmosquera@isciii.es

Accepted 1 September 2004

DOI 10.1002/jmv.20248

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com)

2005, and this low level must be maintained until 2007 [Ramsay, 1997]. Seroprevalence of measles virus IgG antibodies detected in the Spanish population was found to be higher than 90%, reaching 98% in the population over 20 years of age, as shown by seroepidemiologic surveys run in 1996 [Amela and Pachón, 2000a]. In view of these levels, the aim of the plan in Spain is to eradicate measles virus by 2005.

Sequences from Spanish SSPE patients who had contracted the acute infection in the sixties belonged to genotype F [Rima et al., 1997]. Similarly, it is thought that from approximately 1970 to 1979 the circulating genotype was C1. Genotype C2 was prevalent in 1992 and 1993 but was then replaced by D3, renamed as D6 in 1998 [WHO, 1998], which was circulating in Spain from autumn 1993 until 1997 [Rima et al., 1997; Fernandez-Munoz et al., 1999]. Alteration of endemic genotypes was not rare, but the cause is unknown [Santibanez et al., 2002; Nakayama et al., 2003]. This circulation pattern is typical of countries with endemic measles virus circulation and high incidence of measles [Truong et al., 2001; Kouomou et al., 2002; Horm et al., 2003; Mbugua et al., 2003; Zhou et al., 2003]. Importation of a new genotype into a country with high seroprevalence may lead to outbreaks in the susceptible population [Rima et al., 1997] and genetic analysis will confirm a single chain of transmission [Oliveira et al., 2002].

Measles cases have decreased very significantly in Spain in recent years from 429 cases per 100,000 inhabitants (annual average of 150,000 cases) up to 1977 [Amela and Pachón, 2000b] to 0.18 cases per 100,000 inhabitants in 2002 (64 cases) [Peña-Rey et al., 2003]. Consequently, the virus circulation patterns may have changed and it would be important to describe the current situation of measles genotypes in Spain, not only to know the impact of the elimination plan but also to contribute to the general knowledge of the measles epidemiology in the European region.

This report describes the genotypes detected in Spain over the period 2001–2003, following the guidelines of the Measles Elimination Plan laid down in 2000. A new PCR able to amplify measles virus RNA directly from clinical specimens, as well as from cell culture isolates, in order to genotype by genomic sequencing was developed for this purpose. Sequences were compared with those found in GenBank database from the rest of the world in an attempt to establish their geographical origin.

METHODS

Specimens

Reference strains Mvi/Edmonston-wt.USA/54 (genotype A), Mvi/Illinois.USA/89/1 “Chicago-1” (genotype D3), Mvi/Palau.BLA/93 (genotype D5), Mvi/Bangkok.THA/93/1 (genotype D5), Mvi/Maryland.USA/77 “JM” (genotype C2), Mvi/New Jersey. USA/94/1 (genotype D6), Mvi/Hunan.CHN/93/7 (genotype H1), Mvi/Montreal.CAN/89 (genotype D4), and Mvi/Yaounde.CAE/12.83 “Y-14” (genotype B1) were used for PCR standar-

dization (reference strain supplied by the WHO Measles Strain Bank, Measles Virus Section, Centers for Control and Prevention, Atlanta, GA 30333). Through 2001–2003, 522 specimens from 690 patients with a suspect of measles virus infection received in our laboratory were positive for measles virus by multiplex nested retrotranscriptase PCR (MNRT-PCR) [Mosquera Mdel et al., 2002]. Genotyping was tried on all sporadic cases, and at least on one specimen from each outbreak. One hundred eighty-seven out of the 522 MNRT-PCR positive samples belonged to the same outbreak in Almería (Andalusia Autonomous Community). The genotyped cases were chosen to cover different places and the whole period of the outbreak, besides all post-vaccination suspected cases were genotyped. Thirty urines, 16 pharyngeal exudates, and 3 sera corresponding to a total of 49 genotyped cases are shown in this report. Two positive cases by MNRT-PCR in blood dried on filter paper from Equatorial Guinea are also included [Mosquera et al., 2004]. Thirty-six of 39 with available serum sample plus one case from Equatorial Guinea had detectable specific measles virus IgM by the Enzygnost Anti-Measles/IgM kit from Dade Behring (Germany), three cases resulted IgM negative. Nineteen of the 50 samples with isolation in B95a was attempted to yielded the strain [Carlson et al., 1998].

Primer Design

Genomic sequences of the complete measles virus genome were obtained from databases. Sequences were aligned using the MEGALIGN application of the DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, WI.) package; these alignments were used for primer design. Primers for the primary PCR reaction were: GSAR1F (sense) 5'TTCARAACAARTTYAGTGCAGG3', positioned from nucleotide 1067 to 1088; GSAR1R (antisense) 5'GRGC-CCGGAKGCATTCCAG3', position 1862-1844. Primers for nested reaction were: GSAR2F (sense) 5'GAGTGGAAGTTGAAAACCTCCAT3', position 1127–1148; GSAR2R (antisense), 5'CGTGCCTGYTCYTCT-GCCAT3' position 1827–1808. Positions referred to the Edmonston strain, accession number X16565. These primers were synthesized by a commercial customer service (Sigma-Genosys Ltd., Cambridgeshire, UK).

Extraction Method

RNA was extracted from 100 µl of clinical samples using the Magna Pure LC Total Nucleic Acid Isolation kit in a Magna Pure LC automatic extractor (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), following the manufacturer's instructions. As a part of the internal control system, a plasmid described previously [Casas et al., 1997] was also included in the lysis buffer, thus PCR reaction tubes contained approximately 50 molecules.

Retrotranscriptase and Amplification

A coupled RT-amplification reaction, using the Access RT-PCR System kit (Promega, Madison, WI) was

performed. A total of 5 µl of extract was added to a PCR mixture containing 3mM MgSO₄; 500 µM of dATP, dGTP, dCTP, and dTTP; 0.5 µM of measles virus primary reaction primers; 10 µl of AMV/Tfl 5× reaction buffer; 5 U of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase and 5 U of *Thermus flavus* DNA polymerase to give a final volume of 50 µl. A pair of primers specific for the internal control plasmid [Casas et al., 1997] was also included to give a final concentration of 0.2 µM each. Tubes were placed in a PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Watertown, MA) programmed as follows: 45 min at 48°C for RT and 2 min 94°C for reverse transcriptase inactivation and cDNA denaturation, followed by 30 cycles of 1 min of denaturation at 95°C, 1 min of annealing at 57°C, and 1 min of elongation at 72°C. Elongation was extended to 5 min in the last cycle.

For the nested reaction, 1 µl of the primary amplification product was added to 49 µl of a new PCR mixture containing 4 mM MgCl₂; 500 µM of dATP, dGTP, dCTP, and dTTP; 0.2 µM of nested reaction primers; 0.2 µM of internal control specific nested reaction primers [Casas et al., 1997]; 5 µl of 10× PCR buffer II (Roche Molecular Systems, Inc., CA), and 0.25 U of *Taq* DNA polymerase (Amplitaq DNA Polymerase, Roche Molecular Systems, Inc.). The thermal program consisted of a first cycle of 2 min at 94°C, followed by 30 cycles of 1 min of denaturation at 93°C, 1 min of annealing at 60°C, and 1 min of elongation at 72°C. Elongation was extended to 5 min in the last cycle. Ion magnesium, deoxynucleoside triphosphate, and primer concentrations were selected for both primary and nested amplifications, as a result of standardization experiments, as well as hybridization and denaturation temperatures.

PCR products were visualized and sized by gel electrophoresis in 2% agarose containing 0.5 µg of ethidium bromide per ml in Tris-borate-EDTA buffer and were visualized under UV light. Expected band size was 700 bp. Positive samples showed the specific measles virus band and the 140-bp internal control band. Samples that showed no band were retested, and those that lacked any band after repeat testing were assumed non-genotypable.

Standard precautions were taken to avoid carryover contamination. Pipetting was carried out with aerosol-resistant tips, and different bio-safety cabinets were used for sample extraction and first amplification or nested amplification. Amplicon detection and sequencing were performed in a different room.

Amplicon Purification

Forty microliter of the amplicon was mixed with 40 µl of 5 M ammonium acetate, vortexed, 80 µl of isopropanol was added, vortexed, and centrifuged 10 min at 4°C and 14,000 rpm. The supernatant was then removed. After that, 200 µl of 70% ethanol was added, vortexed, and centrifuged 10 min at 4°C and 14,000 rpm. The supernatant was removed once again until the pellet was

TABLE I. Measles Virus Genotype Distribution by Year and Autonomous Community During 2001–2003 in Spain

Auton. comm.	2001	2002	2003
I. Madrid	<i>B3</i> ^a	<i>C2</i>	<i>C2</i>
II. Balearic I.	D7, A, H1		
III. Valencia		<i>D7, D4</i>	D8, D7
IV. Extremadura		<i>A</i>	
V. Andalusia			B3, A, C2, D7
VI. Canary I.		<i>D7</i>	
VII. Murcia			B3

^aItalics indicate sporadic cases.

Bold type indicates outbreak cases.

totally dry. The pellet was resuspended in 10 µl of RNAase free water.

Sequencing

The sequencing reaction was carried out on both DNA strains by mixing 4 µl of BigDye terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), 2 µl of either GSAR2F or GSAR2R primers, 2 µl of RNAase free water and 2 µl of purified amplicon in a 200 µl PCR tube. The sequencing reaction was performed in a PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Watertown, MA) as follows: 94°C for 3 min to denaturize the target and 25 cycles of 96°C 10 sec, 50°C 5 sec and 60°C. Products were run on an ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) automatic sequencer using the dideoxynucleotide chain termination method.

Sequence Analysis

Sequences were arranged using the EditSeq and SeqMan programs in the DNASTAR package (Lasergene, DNASTAR, Inc., Madison, WI), aligned in ClustalX (EMBL, Heidelberg, Germany. May 1994) [Thompson



Fig. 1. Genotype distribution in Spain during 2001–2003. Roman numerals correspond to Autonomous Communities shown in Table I.

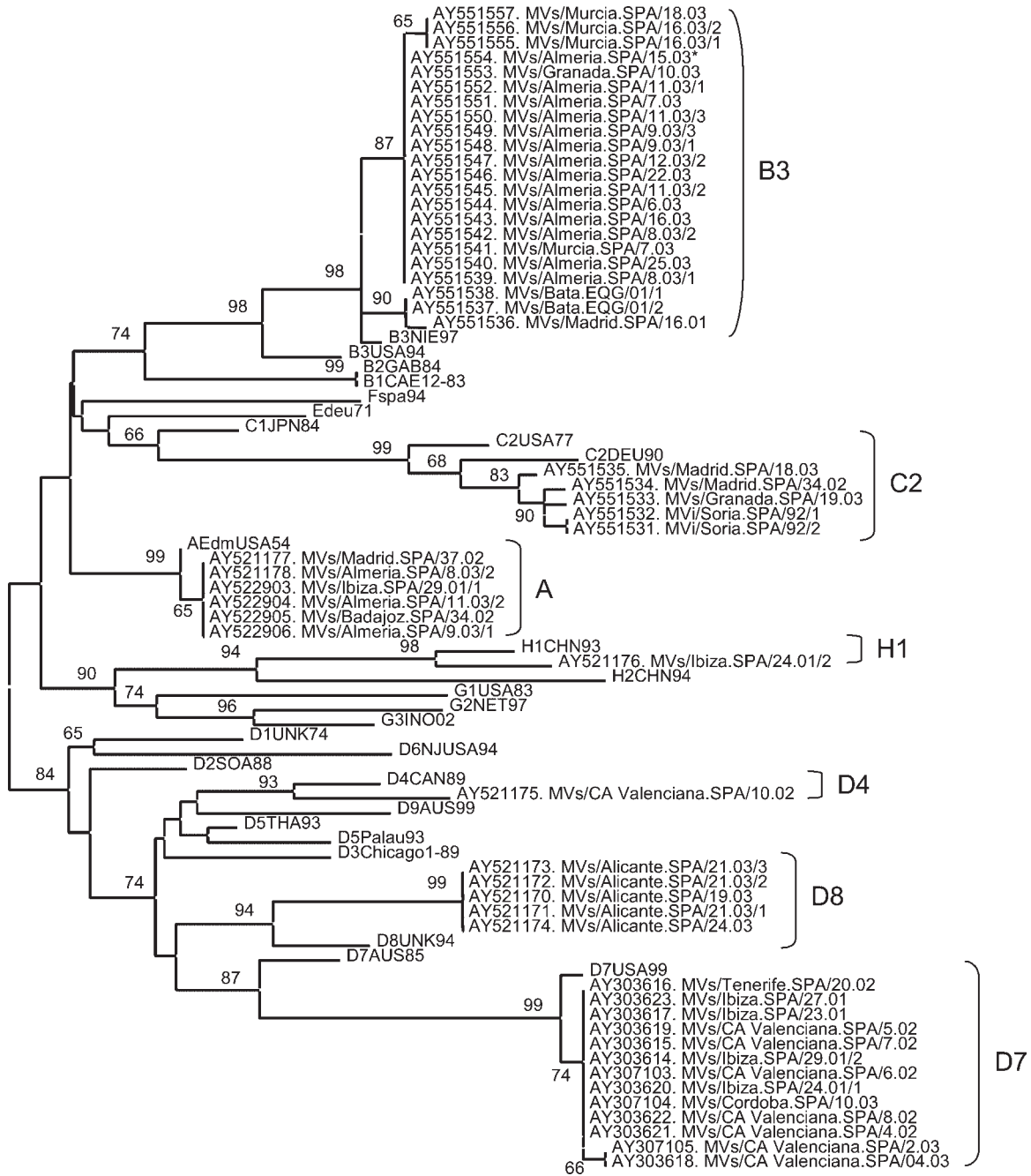


Fig. 2. Phylogenetic representation of measles reference strains and Spanish sequences. All tree figures were based on the analysis of the 456 nucleotides of the C-terminus region of the nucleoprotein gene. The names of Spanish sequences are made up of: "Accession Number to GenBank. Sequence Identification." Sequence identification is according to WHO nomenclature. *Another 39 identical sequences were genotyped but not submitted to GenBank. The sequences shown represent different stages of the outbreak.

et al., 1997] and analyzed using the MEGA 2.1 program [Kumar et al., 2001] to obtain distance trees using the neighbor-joining Kimura 2p method with 1,000 bootstrap replications. First, the sequences obtained in this study were analyzed together with the WHO reference strains [WHO, 2003] in order to establish the genotype and send them to GenBank (Fig. 2). Second, each sequence found in the databases was genotyped following the same method (data not shown). Finally, individual

trees of each genotype were built with the sequences from this study, the correspondent sequences of the same genotype from the databases, and the reference sequences (Figs. 3–6).

RESULTS

All nine-reference strains were genotyped correctly. Eighty-five of 90 patients were genotyped. They

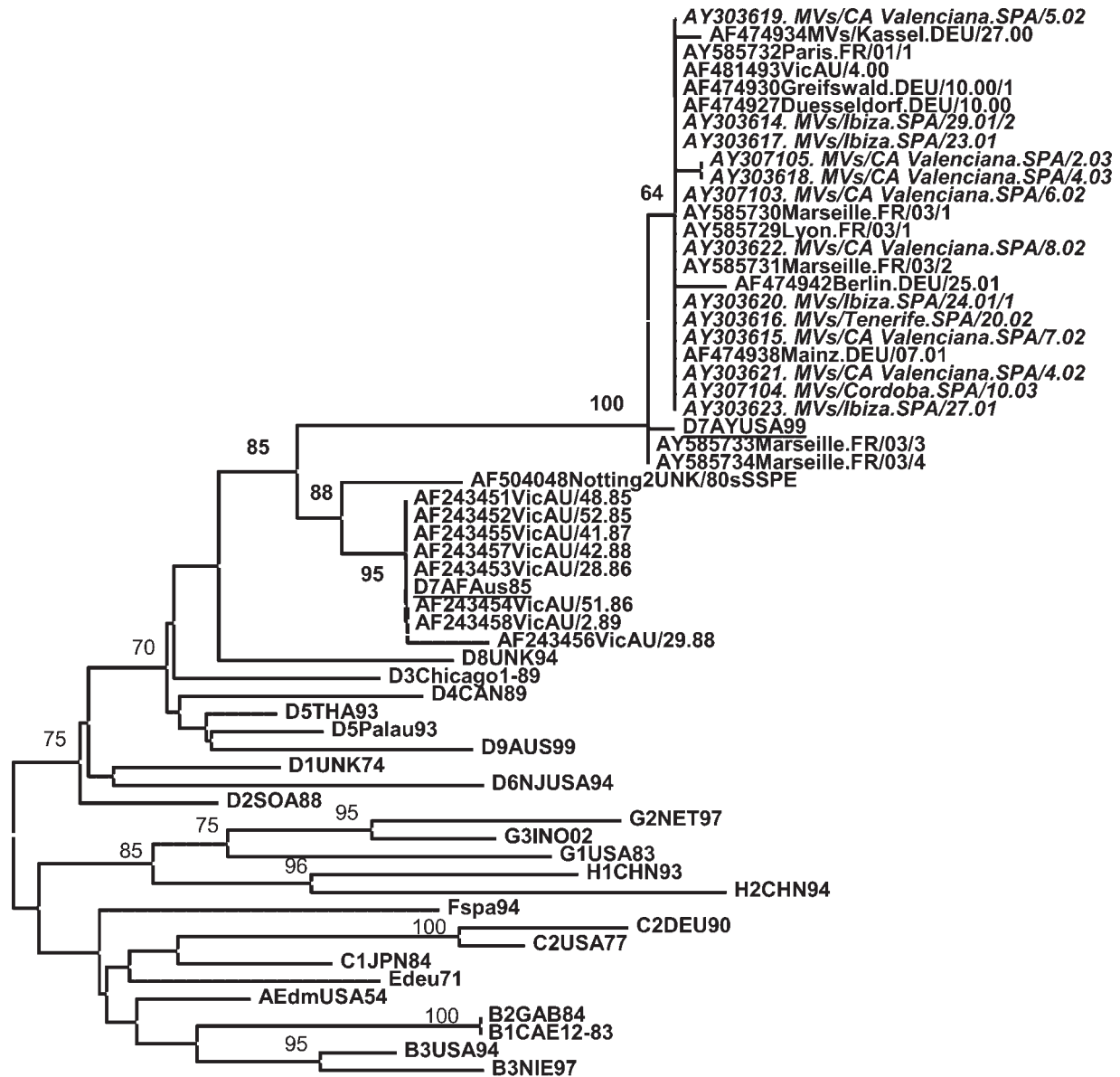


Fig. 3. GenBank, reference, and Spanish sequences of genotype D7. Spanish sequences are shown in italics. The reference sequence of the corresponding genotype is underlined. All GenBank sequences are named with its Accession Number, place, year, and strain number. Bootstrap values are shown when above 70 or when interesting for the study.

included 52 urines, 33 respiratory samples, 4 sera, and 1 conjunctival swab. Seventy-two (84.7%) patients of 85 were measles specific IgM positive, 3 (3.5%) were IgM negative and 10 (11.7%) unknown. Among the five non-genotypable cases, positive by MNRT-PCR [Mosquera Mdel et al., 2002] three were measles specific IgM positive while two had unknown specific measles virus IgM. Forty-eight cases out of 90 were culture negative. The five non-genotypable cases also were negative by culture in B95a. It was, therefore, possible to genotype all culture positive and 90.5% of culture negative cases from specimen.

Sixty-one cases of genotype B3, 13 D7, 6 A, 5 D8, 3 C2, 1 H1, and 1 D4 were found. The geographical distribu-

tion of these genotypes as it can be seen in Table I and Figure 1 comprises the following: Autonomous Communities, Madrid, Balearic Islands, Valencia Community, Extremadura, Andalusia, Canary Islands, and Murcia. The tree in Figure 2 shows the grouping of each sequence with the corresponding genotype reference strain. It also contains two sequences from 1992, genotyped in this study, whose genotype (C2) is the same circulating in Spain by then [Rima et al., 1997; Fernandez-Munoz et al., 1999].

Fifty-three cases of genotype B3 were found in an outbreak in Almería (Andalusia Autonomous Community), imported from Africa by a sailor who had disembarked in at an Algerian port before arriving in

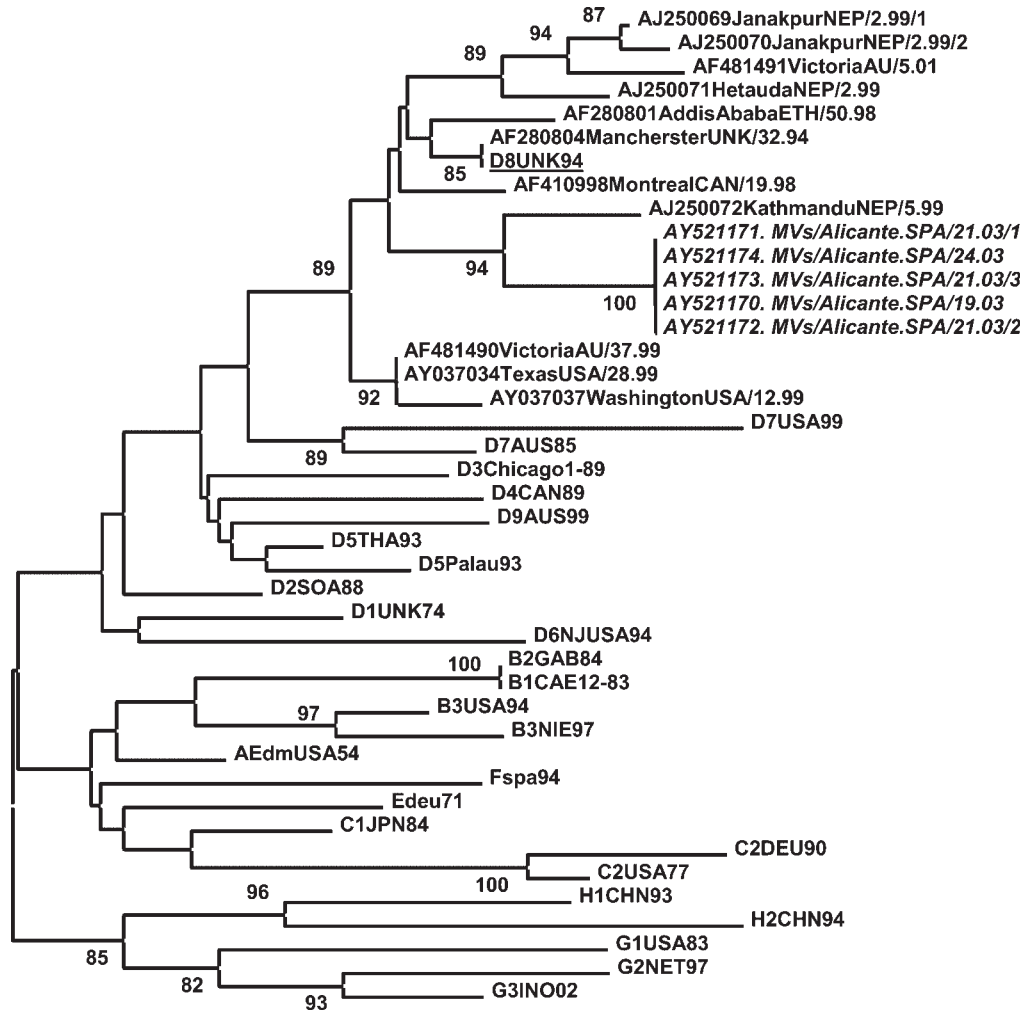


Fig. 4. GenBank, reference, and Spanish sequences of genotype D8. Spanish sequences are shown in italics. The reference sequence of the corresponding genotype is underlined. All GenBank sequences are named with its Accession Number, place, year, and strain number. Bootstrap values are shown when above 70 or when interesting for the study.

Almería. The disease affected 195 people with mean age of 15.9 ± 11.4 years, ranging from 0 to 44 years. Children 0–2 years old (26.6%) and adults 20–35 years old (58.2%) constituted the main groups and the outbreak extended from January to July 2003. Another B3 measles from a patient who had recently travelled to Equatorial Guinea grouped with two whole bloods dried on filter paper sent to our laboratory from Bata Regional Hospital (Equatorial Guinea) [Mosquera et al., 2004].

Four cases of genotype D7 were from an outbreak in Ibiza (Balearic Islands) and nine came from sporadic cases. Three genotype A sequences detected within the first 10 days after vaccination, belonging to the Almería outbreak, as well as an additional sporadic case were considered vaccine strains seeing its association with vaccine sequences in the phylogenetic tree (data not shown) [Rota and Bellini, 2003]. The date of vaccination of two additional A cases is unknown, one from the Ibiza outbreak, and another sporadic case. They were also considered vaccine strains seeing its phylogenetic

analysis. All five cases of the same outbreak in Benidorm (Alicante, Valencia Autonomous Community, eastern Spain) belonged to genotype D8. C2 cases were sporadic, although one of them was found in the vicinity of Almería at the time of this outbreak. The only H1 case was found in an adopted girl from China, at the same time and in the same area as the cases from the D7 outbreak in Ibiza. Finally, the only D4 case was sporadic and found in the Valencia Autonomous Community in 2002.

Genotyping enabled one outbreak of D7 in Ibiza in 2001 to be detected and characterized, excluding one post-vaccine case and one H1 case as mentioned above. Three post-vaccine cases, as well as one C2 and one D7 genotypes from contiguous provinces could be excluded from the Almería outbreak. Furthermore, it was also possible to link five cases from two different areas close to Almería (Murcia and Granada) to the outbreak. The index case of this outbreak was also detected retrospectively by genotyping serum from the sailor who had



Fig. 5. GenBank, reference, and Spanish sequences of genotype B3. Spanish sequences are shown in italics. The reference sequence of the corresponding genotype is underlined. All GenBank sequences are named with its Accession Number, place, year and strain number. Bootstrap values are shown when above 70 or when interesting for the study.

travelled to Algeria before visiting Almería in mid January. The genotype D8 outbreak in Benidorm (Alicante, Valencia Community) that occurred during May–June of 2003 was ruled out as being related to the B3 outbreak. It bore a close association with a strain from Nepal, 1999, with a bootstrap of 98 (Fig. 4). In the case of the sporadic genotype D4, its phylogenetic analysis shows that it associates with a strain from Central Kenya 2002, with a bootstrap of 98, suggesting that this genotype is of African origin (data not shown). With regard to genotype D7 (Fig. 3) the only outstanding feature is that the sequences in this study group has a

low bootstrap with German, French, and Australian strains from the same time period, 2000 to 2003. Sequences of the B3 outbreak grouped in a different cluster of those from West and Central Africa and Tunisia. However, the sequence from the patient who travelled to Equatorial Guinea, as well as the ones obtained from whole blood in filter paper (Fig. 5) were similar to a strain from Cameroon, as expected. The phylogenetic tree constructed with all sequences found in PubMed shows that the Chinese H1 case groups with Japanese strains from 2001 to 2002 better than with the Chinese ones from the early nineties (data

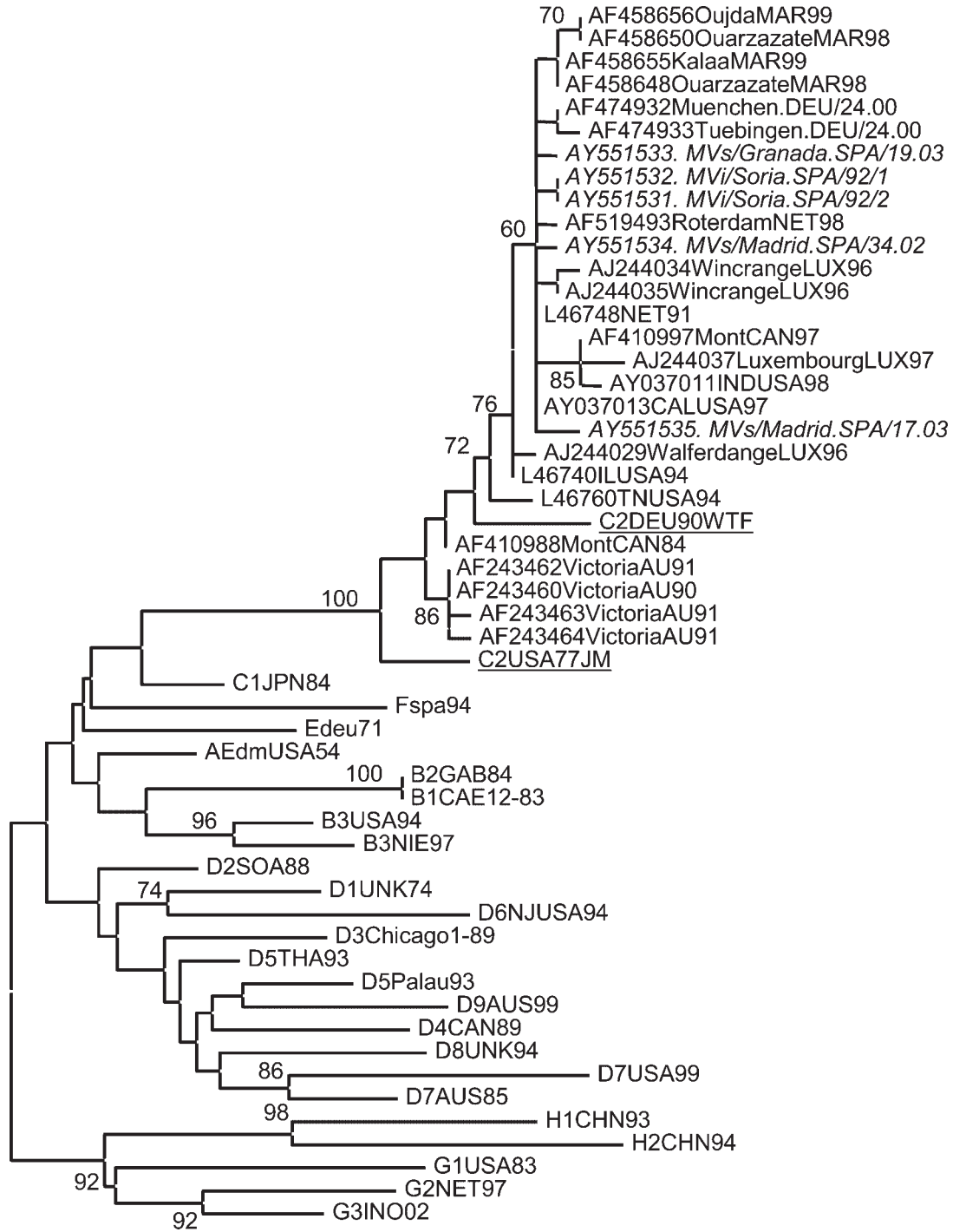


Fig. 6. GenBank, reference, and Spanish sequences of genotype C2. Spanish sequences are shown in italics. The reference sequence of the corresponding genotype is underlined. All GenBank sequences are named with its Accession Number, place, year, and strain number. Bootstrap values are shown when above 70 or when interesting for the study.

not shown). Finally, strains from Morocco, Germany, Luxemburg, Holland, or Canada group with a low bootstrap with C2 sequences from this study, were not only those found in 2001 to 2003 but also two strains from an outbreak in the province of Soria (Central Spain) occurring in 1992 (Fig. 6).

DISCUSSION

Genotyping is a useful tool in the context of outbreaks. It did not only allow us to establish links with cases occurring simultaneously in other locations but also to exclude post-vaccination cases. In the case of the

Almería outbreak, genotyping allowed the localization of the index case through retrospective testing of a serum sample from the sailor. This was possible because of the high sensitivity of the PCR technique used. Furthermore, direct genotyping from specimens is quicker and allows a greater number of genotypes to be obtained, since culture has a lower sensitivity. Obviously, isolates provide additional information about biological and antigenic properties of the strain that is of great epidemiological interest and cannot be obtained from the sequence [Liebert et al., 1994; Fayolle et al., 1999; Manchester et al., 2000]. For that reason, viral isolation should always be attempted.

In cases where the geographical origin was known, it usually coincides with the genotype that is circulating in that area. Such is the case of an H1 strain found in the adopted Chinese girl, who could be excluded from the D7 outbreak in Ibiza (Balearic Islands). Besides, phylogenetic trees allow us to establish hypothesis as regards the imported origin of the sequences of unknown origin found in Spain. Nevertheless, in the case of the Algerian genotype B3, it can be hypothesized that this genotype, which neither groups phylogenetically with genotypes from West and Central Africa nor with the genotype from Tunisia (Fig. 5), might also be circulating in North Africa, despite the fact that the cases imported from Morocco were C2. Obviously the ability to discriminate and determine the origin of a particular strain will be enhanced as soon as more information from other countries is studied and published.

D7 is the only genotype present throughout the entire period 2001–2003. However, the shortage of strains for comparison makes it difficult to establish whether they are indigenous in origin or imported. In any case, more accurate studies must be done to clarify whether or not this genotype is currently circulating in Spain. Two different groups can be observed, depending on the year. Strains from the eighties do not group with those from 1999 to 2003. On the other hand, the bootstrap found in the 1999–2003 sequences is too low, only 64 (Fig. 3).

The variety of genotypes found in a country over a short period of time indicates to some extent the situation of the elimination program [Chibo et al., 2000, 2003; Rota et al., 2002; Rota and Bellini, 2003]. Until 1997 data on genotypes found in Spain showed a clear prevalence of one of these, with replacement by another [Rima et al., 1997; Fernandez-Munoz et al., 1999]. This pattern is typical of endemic areas with a high number of measles cases per year, due to low vaccine coverage [Truong et al., 2001; Kouomou et al., 2002; Horm et al., 2003; Mbugua et al., 2003; Zhou et al., 2003]. However, the seroepidemiological survey run in 1996 showed that vaccine coverage in Spain is above the level recommended by WHO for preventing virus circulation for the majority of age groups [Amela and Pachón, 2000a]. The general pattern found in this work in the period 2000–2003 characterized by the combination of different genotypes, seven in Spain in a short time suggests that there is no continuous circulation of indigenous measles virus, nevertheless there were a

number of different episodes imported from areas that could be clearly established in some cases as C2, B3, or H1. This pattern is consistent with the low number of measles cases currently detected in Spain in the last years, a fact that also supports the hypothesis of the lack of indigenous circulation. It is true that only a long-time observation of a pattern of imported measles virus genotypes in conjunction with sustained very low incidence of measles can determine the eradication of the virus. Nevertheless, in view of these results of majority of imported cases and low incidence, the inclusion of Spain amongst the countries with circulation of indigenous measles of genotypes C2 and D6 [WHO, 2001; Rota and Bellini, 2003] at least should be reconsidered.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Aurora de Miguel and Pablo Martínez from the Genomic Unit of the Centro Nacional de Microbiología of the Instituto de Salud Carlos III for their help in the sequencing made in this report.

REFERENCES

- Amela C, Pachón I. 2000a. [Estudio seroepidemiológico: Situación de las enfermedades vacunables en España]. Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Epidemiología, editor. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. 119p.
- Amela C, Pachón I. 2000b. [La Vigilancia Epidemiológica del sarampión en el contexto del “Plan de acción para eliminar el sarampión en España”]. Boletín Epidemiológico Semanal 8:169–172.
- Carlson J, Artsob H, Douville-Fradet M, Duclos P, Fearon M, Ratnam S, Tipplés G, Varughese P, Ward B, Sciberras J. 1998. Measles surveillance: Guidelines for laboratory support. Working Group on Measles Elimination. *Can Commun Dis Rep* 24:33–44.
- Casas I, Tenorio A, Echevarria JM, Klapper PE, Cleator GM. 1997. Detection of enteroviral RNA and specific DNA of herpesviruses by multiplex genome amplification. *J Virol Methods* 66:39–50.
- Chibo D, Birch CJ, Rota PA, Catton MG. 2000. Molecular characterization of measles viruses isolated in Victoria, Australia, between 1973 and 1998. *J Gen Virol* 81:2511–2518.
- Chibo D, Riddell M, Catton M, Lyon M, Lum G, Birch C. 2003. Studies of measles viruses circulating in Australia between 1999 and 2001 reveals a new genotype. *Virus Res* 91:213–221.
- Fayolle J, Verrier B, Buckland R, Wild TF. 1999. Characterization of a natural mutation in an antigenic site on the fusion protein of measles virus that is involved in neutralization. *J Virol* 73:787–790.
- Fernandez-Munoz R, Carabana J, Caballero M, Liton PB, Duque BM, Garcia-Villalon MD, Celma ML. 1999. [Molecular epidemiology of measles virus]. *Rev Esp Salud Publica* 73:605–608.
- Hanses F, Truong AT, Ammerlaan W, Ikusika O, Adu F, Oyefolu AO, Omilabu SA, Muller CP. 1999. Molecular epidemiology of Nigerian and Ghanaian measles virus isolates reveals a genotype circulating widely in Western and Central Africa. *J Gen Virol* 80:871–877.
- Horm SV, Dumas C, Svay S, Feldon K, Reynes JM. 2003. Genetic characterization of wild-type measles viruses in Cambodia. *Virus Res* 97:31–37.
- Kouomou DW, Nerrienet E, Mfoupouendoun J, Tene G, Whittle H, Wild TF. 2002. Measles virus strains circulating in Central and West Africa: Geographical distribution of two B3 genotypes. *J Med Virol* 68:433–440.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. 2001. MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17:1244–1245.
- Liebert UG, Flanagan SG, Loffler S, Baczkó K, ter Meulen V, Rima BK. 1994. Antigenic determinants of measles virus hemagglutinin associated with neurovirulence. *J Virol* 68:1486–1493.
- Manchester M, Eto DS, Valsamakis A, Liton PB, Fernandez-Munoz R, Rota PA, Bellini WJ, Forthal DN, Oldstone MB. 2000. Clinical isolates of measles virus use CD46 as a cellular receptor. *J Virol* 74:3967–3974.

- Mbugua FM, Okoth FA, Gray M, Kamau T, Kalu A, Eggers R, Borus P, Kombich J, Langat A, Maritim P, Lesiamon J, Tipples GA. 2003. Molecular epidemiology of measles virus in Kenya. *J Med Virol* 71:599–604.
- Mosquera MdM, Echevarria JE, Puente S, Lahulla F, de Ory F. 2004. Use of whole blood dried on filter paper for detection and genotyping of measles virus. *J Virol Methods* 117:97–99.
- Mosquera MdM, de Ory F, Moreno M, Echevarria JE. 2002. Simultaneous detection of measles virus, rubella virus, and parvovirus B19 by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 40:111–116.
- Nakayama T, Zhou J, Fujino M. 2003. Current status of measles in Japan. *J Infect Chemother* 9:1–7.
- Oliveira MI, Rota PA, Curti SP, Figueiredo CA, Afonso AM, Theobaldo M, Souza LT, Liffick SL, Bellini WJ, Moraes JC, Stevien KE, Durigon EL. 2002. Genetic homogeneity of measles viruses associated with a measles outbreak, Sao Paulo, Brazil, 1997. *Emerg Infect Dis* 8:808–813.
- Peña-Rey I, Sanz M, Amela C. 2003. Plan Nacional de Eliminación del Sarampión. Evaluación del año 2002. *Boletín Epidemiológico Semanal* 11:73–76.
- Ramsay M. 1997. Expanded Programme on Immunization (EPI). Strategic Plan for the elimination of measles in the European Region; Berlin, Germany: World Health Organization.
- Rima BK, Earle JA, Baczko K, ter Meulen V, Liebert UG, Carstens C, Carabana J, Caballero M, Celma ML, Fernandez-Munoz R. 1997. Sequence divergence of measles virus haemagglutinin during natural evolution and adaptation to cell culture. *J Gen Virol* 78: 97–106.
- Rota PA, Bellini WJ. 2003. Update on the global distribution of genotypes of wild type measles viruses. *J Infect Dis* 187:S270–S276.
- Rota PA, Liffick SL, Rota JS, Katz RS, Redd S, Papania M, Bellini WJ. 2002. Molecular epidemiology of measles viruses in the United States, 1997–2001. *Emerg Infect Dis* 8:902–908.
- Santibanez S, Tischer A, Heider A, Siedler A, Hengel H. 2002. Rapid replacement of endemic measles virus genotypes. *J Gen Virol* 83(Pt 11):2699–2708.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25:4876–4882.
- Truong AT, Mulders MN, Gautam DC, Ammerlaan W, de Swart RL, King CC, Osterhaus AD, Muller CP. 2001. Genetic analysis of Asian measles virus strains—new endemic genotype in Nepal. *Virus Res* 76:71–78.
- WHO. 1998. Expanded Programme on Immunization (EPI). Standardization of the nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses. *Wkly Epidemiol Rec* 73:265–269.
- WHO. 1999. Measles. A strategic framework for the elimination of measles in the European Region. The Expanded Programme on Immunization in the European Region of WHO; Copenhagen.
- WHO. 2001. Nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses (update). *Wkly Epidemiol Rec* 76:249–251.
- WHO. 2003. Update of the nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses: New genotypes and reference strains. *Wkly Epidemiol Rec* 78:229–232.
- Zhou J, Fujino M, Inou Y, Kumada A, Aoki Y, Iwata S, Nakayama T. 2003. H1 genotype of measles virus was detected in outbreaks in Japan after 2000. *J Med Virol* 70:642–648.

Evaluation of Diagnostic Markers for Measles Virus Infection in the Context of an Outbreak in Spain

María M. Mosquera,^{1*} Fernando de Ory,¹ Virtudes Gallardo,² Loreto Cuenca,³ Mercedes Morales,⁴ Waldo Sánchez-Yedra,⁴ Teresa Cabezas,⁵ Juan M. Hernández,⁶ and Juan E. Echevarría¹

Servicio de Microbiología Diagnóstica, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, 28220 Majadahonda, Madrid,¹ Dirección General de Salud Pública, Consejería de Salud, Junta de Andalucía, 41020 Sevilla,² Delegación de Salud de Almería, Consejería de Salud, Junta de Andalucía, Almería,³ Hospital Torrecárdenas, 4009 Almería,⁴ Hospital de Poniente, 4700 El Ejido (Almería),⁵ and Hospital La Inmaculada, 4600 Almería,⁶ Spain

Received 29 June 2005/Returned for modification 19 July 2005/Accepted 29 July 2005

A measles outbreak occurred from January to July 2003 in Spain, despite the fact that the Plan of Eradication of Measles and its surveillance program had been set up in 2001. Different diagnostic markers for measles virus infection were compared for 246 patients in tests of serum, urine, and pharyngeal exudate specimens. Measles virus immunoglobulin M (IgM) and IgG and rubella virus and parvovirus IgM levels in serum were assayed. Multiplex PCR was done on urine, serum, and pharyngeal exudates, and isolation of measles virus in the B95a cell line from urine was attempted. At least one positive marker for measles virus was obtained from 165 patients (67.1%; total number of patients, 246). A total of 136 cases (82.4% of the patients showing positive markers) were diagnosed by PCR and/or isolation and IgM detection methods. The results for 27 patients (16.4%) were positive only by direct methods. The results for two patients (1.2%) were positive only by IgM detection. In the case of the first group (136 cases), the time elapsed from appearance of the rash was significantly longer than in the case of the group which was only positive by PCR. Besides, 8 out of 27 PCR-positive IgM-negative cases showed specific IgG results, suggesting either secondary vaccine failure or reinfection. Numbers resulting from PCR performed with pharyngeal exudates proved to be significantly higher than those obtained with other specimens. Phylogenetic analysis showed the presence of genotype B3. The results strongly back the World Health Organization recommendation that detection of IgM should be supplemented by PCR and isolation for the diagnosis of measles virus infection.

Measles virus (MeV) is a highly contagious virus which produces a usually mild vaccine-preventable exanthematic disease in children. Nevertheless, the complications of this illness are a common cause of death in developing countries, where poor nourishment or immunodeficiency predisposes the patient to secondary infections such as bacterial pneumonia or other fatal diseases, for example, encephalitis or severe diarrhea (10).

Measles continues to be a menace to millions of children worldwide. Currently, the World Health Organization (WHO) has set up a number of programs starting in 1999 to reduce measles mortality worldwide by 50% by the end of 2005 and to reduce mortality as a whole by two-thirds by the year 2015 for children less than 5 years of age. Even though the rate of measles-related mortality decreased by 39% between 1999 and 2003, reducing deaths from 873,000 to 530,000, measles virus continues to be a leading cause of morbidity and mortality among children in developing countries (7).

Although the region of the Americas is near its goal of eliminating the virus, the remainder of regions are immersed in different stages of their programs, from an initial decrease of measles-related mortality in most African and southeast Asian countries to the more advanced situation of eradication pro-

grams in the European region. The WHO Regional Office for Europe has set the interruption of indigenous transmission of measles virus and the prevention of congenital rubella virus infection as objectives for 2010.

The vaccination policy in Spain differs between regions (autonomous communities). Generally, the first dose of measles, mumps, and rubella vaccination is given to children at age 15 months and the second at 3 to 6 years of age. In 1996 seroprevalence of measles virus antibodies was over 90% in all age groups, reaching 98% in patients over 20 years of age (1). According to the Spanish Measles Eradication Plan, surveillance should be conducted on every case, and every case must be reported and investigated immediately. Laboratory specimens should be collected and analyzed for measles virus infection markers in every suspected case.

Laboratory diagnosis of MeV infection is a basic tool for the surveillance program. This is mostly based on the detection of immunoglobulin M (IgM) in serum by use of different approaches, indirect enzyme immunoassays (ELISA) being the most widely used (15). On the other hand, viral isolation allows us to obtain the strain for epidemiological studies. However, the sensitivity of the isolation method is low and very dependent on the time of sample collection and transport conditions; the optimal time for virus culture sampling is very early after the onset of symptoms, when specific IgM is not detected (11, 14). Some reports show that genomic detection techniques, namely, PCR, notably improve the performance of the culture method (8) and should consequently be included in measles

* Corresponding author. Mailing address: Unidad de Aislamiento y Detección de Virus, Servicio de Microbiología Diagnóstica, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo s/n, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain. Phone: 34918223682. Fax: 34915097919. E-mail: mmosquera@isciii.es.

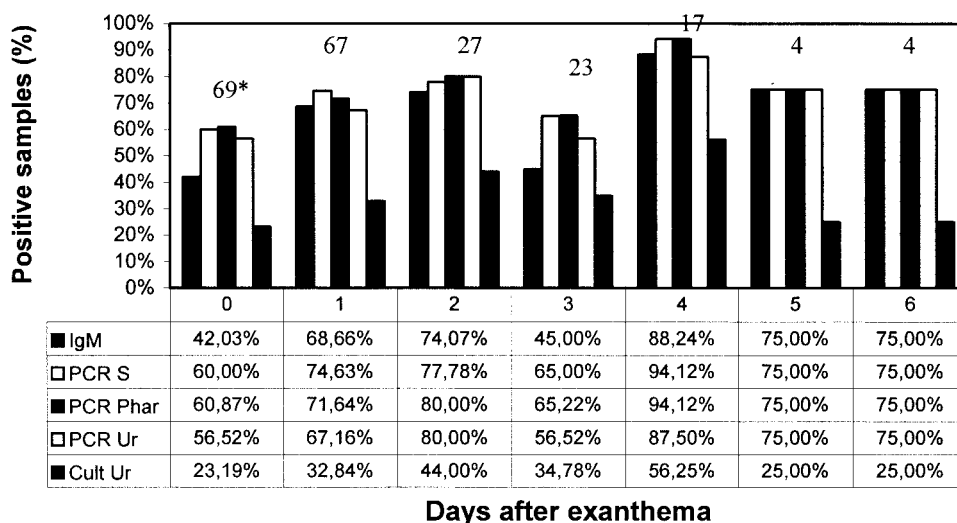


FIG. 1. Distribution of results of detection of IgM in serum (IgM), serum PCR results (PCR S), pharyngeal exudate PCR results (PCR Phar), urine PCR results (PCR Ur), and isolation of MeV (Cult Ur) in percent urine positivity per day after the start of the rash. The number of cases received per day is shown. *, number of specimens received per day.

surveillance protocols. However, there is little available data on the behavior of the PCR techniques as a diagnostic tool in the context of outbreaks.

The aim of this report is to evaluate different infection markers for acute measles virus infection in the setting of a measles outbreak. It compares the efficacy of PCR diagnosis versus classical techniques, such as IgM detection and virus cell culture isolation, in a real situation.

MATERIALS AND METHODS

Specimens. This report studies 246 patients with a complete set of three specimens, namely serum, urine, and pharyngeal exudate specimens. A total of 128 (52.1%) of the patients studied were men and 118 (47.9%) were women, with a mean age of 15.5 ± 12.5 years (mean age \pm standard deviation) and a range of 0 to 60 years. A total of 116 (47.15%) patients with suspected cases of measles virus infection were 20 to 35 years old, and 44 (17.9%) were under 15 months of age. The number of samples collected in relation to the time elapsed from appearance of the rash is shown in Fig. 1. Specimens were collected and processed following WHO recommendations (3). Most of the specimens were sent as soon as collected without freezing, at a storage temperature 4°C, while other were sent in dry ice. All cases came from the same measles outbreak, which affected 317 people on the Almeria coast (Andalusia, Spain) from January to June 2003.

Serological assays. Sera were tested for the presence of MeV-specific IgM, rubella virus (RUBV)-specific IgM, and parvovirus B19 (B19V)-specific IgM and the presence of MeV IgG and for the avidity of MeV IgG. Commercial kits (Enzygnost, Dade Behring, Germany) based on indirect ELISA were used for the detection of MeV-specific and RUBV-specific IgM, and μ -chain capture ELISA was used for the detection of RUBV and parvovirus B19 IgM (respectively, Platelia Rubella IgM [Bio-Rad, Marseille, France] and Parvovirus B19 IgM EIA [Biotrin, Dublin, Ireland]). The tests were run according to manufacturers' instructions. Equivocal results obtained with MeV IgM were also considered positive cases by serology in the absence of a second serum sample.

MeV IgG avidity assays. An Enzygnost avidity kit was used following the manufacturer's instructions. The avidity indexes (AI) were calculated by assigning a 100% value to the mean value of reduction, after two determinations of the positive control treated with the avidity reagent in each assay. All determinations were compared with the corrected value, which was different for each assay. This value was the corrected AI. Hence, comparable interassay values were obtained.

Direct detection. Total nucleic acids were extracted from samples by use of a MagNA Pure LC external lysis protocol automatic extractor (ROCHE, Mannheim, Germany). As a part of the internal control system, a plasmid unrelated to the target viruses was included in the lysis buffer. A previously described multi-

plex reverse transcription-PCR (RT-PCR) method (12) for analysis of MeV, RUBV, and B19V was attempted with all three type of samples. Briefly, a coupled reverse transcription-amplification reaction was performed using an Access RT-PCR system kit (Promega, Madison, Wis.). The measles primers used for the retrotranscription and first reaction were Sar1F (5'CGGAGCTAAGAA GGTGGATAA3') and Sar1R (5'CTCCCATGGCATAGCTCCA3'), while the ones used in the nested reaction were Sar2F (5'CYAGGATTGCTGAAATGATATG3') and Sar2R (5'AAYTTGTTCTGAATTGAGTTC3') (12). A pair of primers specific for the internal control plasmid was also included. For the nested reaction, 1 μ l of the primary amplification products was added to 49 μ l of a new PCR mixture containing nested instead of primary reaction primers and internal-control-specific nested reaction primers. PCR products were visualized and sized by gel electrophoresis in 2% agarose containing ethidium bromide and were visualized under UV light.

Pharyngeal exudates from negative cases were tested for enteroviruses, herpes simplex virus, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, varicella-zoster virus, and human herpesvirus 6 by use of a multiplex PCR (4) as well as by PCR for adenoviruses (2). Two different aliquots of each sample were taken at the time of admission to our laboratory. One aliquot per specimen was tested. In the case of any positive result, the result obtained was confirmed with the second aliquot and only correlated results were considered positive. Unconfirmed positives were counted as negatives. Aliquot tests and PCR tests were run by different laboratories and technicians.

MeV isolation on the B95a cell line was attempted in urine specimens, following WHO recommendations (3); urine was centrifuged at 4°C, and 2 ml of medium was added to the sediment, decontaminated, and inoculated in a cell culture at 75 to 80% confluence.

RESULTS

Indirect and direct detection. A total of 165 cases out of 246 were positive for at least one MeV infection marker for 84 (50.9%) males and 81 (49.1%) females. The mean age in years for these MeV-positive patients was 16 ± 11.32 ; the patients ranged from less than 1 year of age to 44 years of age, although 58.2% (96) were 20 to 35 years old and 19.4% (32) were 15 months old or less (Fig. 2).

Most (136) of the 165 MeV-positive cases were positive by both direct detection and serology, while 27 were positive only by direct detection and 2 only by IgM detection (Fig. 3). The elapsed time between the onset of the rash and sample collection was significantly lower for the 27 patients which were

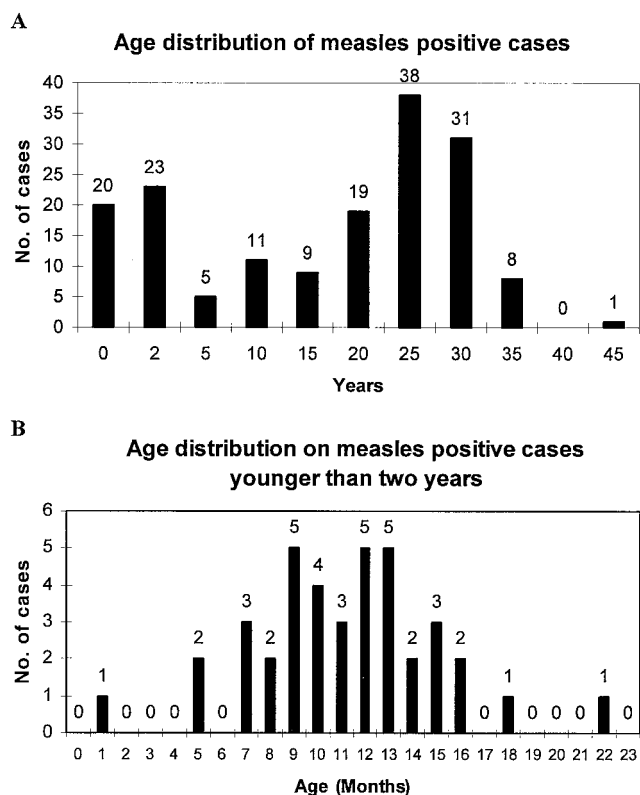


FIG. 2. Ages of measles virus-positive patients. A. Patients from less than 1 to 45 years of age. B. Patients less than 2 years of age.

positive only by direct detection compared to the 138 IgM-positive patients: 0.9 days (95% confidence interval, 0.4 to 1.4) versus 1.8 days (95% confidence interval, 1.5 to 2.1) ($P < 0.05$ by the chi-square method).

An MeV IgM-positive result or an equivocal result was obtained in 138 cases. A total of 105 serum, 161 pharyngeal exudate, and 152 urine specimens gave a positive result for MeV by multiplex PCR. Seventy-three urine specimens yielded MeV virus for the B95a cell line. PCR was significantly more effective than isolation as a diagnostic marker, as shown by the chi-square method, corrected by the Fisher exact two-tailed test P value ($P < 0.05$). PCR was also significantly higher ($P < 0.005$) when applied to pharyngeal exudates, in comparison

with PCR on urine. Moreover, PCRs using both urine and pharyngeal exudate specimens were significantly more effective than IgM detection (Fisher exact two-tailed test P value < 0.01).

The index case was a sailor who had come from an Algerian port and disembarked in Almería and whose genotype (B3) was determined retrospectively in a stored serum sample directly by PCR and sequencing (13).

MeV IgG avidity assays. To establish the characteristic of the assay, 22 MeV IgG-seropositive healthy adults were included as a control group. The results for 39 patients with positive PCR and IgM detection (9 with positive PCR results only, 2 with positive IgM results only, and 69 with no positive results) were compared with the control group results. From the 22 controls we obtained a mean corrected AI value of 99.5%. The mean corrected AI values were 65.2% for the 39 cases with positive PCR and IgM results, 73% for the 9 samples from cases with PCR-positive results only, and 83.6% for the 69 cases with negative results for both approaches.

IgM-negative cases. Twenty-seven cases which were positive in one or more specimens by direct detection were negative with IgM detection (Table 1). Seventeen cases were IgG negatives. For 9 out of the 10 remaining IgG-positive cases, IgG avidity was tested. Patient 1 showed an avidity index clearly higher than the mean values seen with recent infection cases, suggesting reinfection. The remaining IgG positives were probably false-negative IgM cases, since avidity values were below those obtained in the cases with PCR- and IgM-positive results. In case 10, the only positive finding was viral isolation, this being a probable PCR and IgM false-negative result, bearing in mind the relatively low IgG avidity. However, the possibility of a false positive resulting from the isolation method could not be dismissed.

In relation to IgG-negative results, in six cases there was a known antecedent of recent vaccination (1 to 13 days before onset; patients 11 and 17 to 21). Of these, the case of patient 18 only was confirmed, 10 days after vaccination, as having been caused by a genotype A, which includes the vaccine strains.

On the other hand, the samples collected more than 3 days after the appearance of the rash (patients 23 to 26) could be classified as probable IgM false negatives, since more than 88% of the samples taken at 4 days from onset gave IgM-positive results, as shown in Fig. 1. The remaining cases were

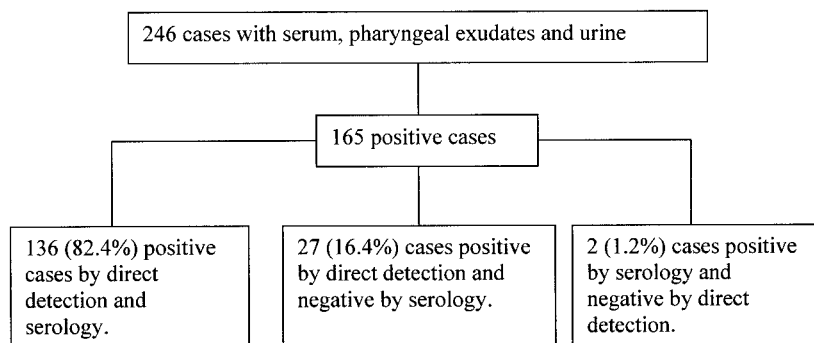


FIG. 3. Table of results obtained by the laboratory in the Almería outbreak.

TABLE 1. Results for IgM-negative cases

Patient	Age	Tsympt ^a	No. of Doses (time to rash) ^b	Result for ^c :				IgG (UI/ml)	Measles virus IgG avidity ^d (%)	MeV genotype	Interpretation ^e
				Urine culture	PCR using serum	PCR using pharyngeal exudates	PCR using urine				
1	27 yr	6	UNK	N	N	P	N	18,325	84	B3	Reinfection
2	30 yr	1	1 (9 days)	N	N	P	N	720	ND	B3	Reinfection/F- IgM
3	31 yr	3	1 (7 days)	P	N	P	P	700	25	B3	F- IgM
4	24 yr	0	1 (13 yr)	N	N	P	P	630	50	B3	F- IgM
5	22 yr	2	UNK	N	N	P	N	290	34	B3	F- IgM
6	21 yr	2	UNK	N	N	P	P	2,700	65	B3	Reinfection/F- IgM
7	22 yr	3	UNK	Cont	P	P	P	3,000	50	B3	Reinfection/F- IgM
8	25 yr	3	UNK	P	P	P	P	400	33	B3	F- IgM
9	34 yr	4	UNK	N	N	P	N	1,100	50	B3	F- IgM
10	5 yr	9	2 (20 mo)	P	N	N	N	1,297	54	B3	F+ culture/F- IgM
11	10 yr	0	1 (13 days)	P	P	P	P	N	N	B3	Early collection
12	10 yr	0	0	N	P	P	P	N	N	B3	Early collection
13	13 yr	0	1	N	P	P	P	N	N	B3	Early collection
14	20 yr	0	UNK	P	P	P	P	N	N	B3	Early collection
15	5 mo	1	0	P	P	P	P	N	N	B3	Early collection
16	20 yr	1	UNK	P	P	P	P	N	N	B3	Early collection
17	27 yr	2	1 (10 days)	N	I	P	P	N	N	B3	Early collection
18	34 yr	2	1 (10 days)	N	N	P	P	N	N	A	Vaccine
19	22 yr	3	1 (1 day)	Cont	P	P	P	N	N	B3	Early collection
20	26 yr	3	1 (1 day)	P	P	P	P	N	N	B3	Early collection
21	11 mo	3	1 (7 days)	N	P	P	P	N	N	B3	Early collection
22	27 yr	3	UNK	N	P	P	P	N	N	B3	Early collection
23	25 yr	4	0	P	P	P	P	N	N	B3	F- IgM
24	9 mo	4	0	N	N	P	N	N	N	B3	F- IgM
25	20 yr	4	UNK	P	P	P	P	N	N	B3	F- IgM
26	26 yr	4	UNK	Cont	P	P	P	N	N	B3	F- IgM
27	23 yr	UNK	1	P	P	P	P	N	N	B3	

^a Tsympt, time from onset of rash to specimen collection.

^b Number of vaccine doses (time from administration to onset of rash). UNK, unknown.

^c P, positive; N, negative; Cont, contaminated; I, inhibited.

^d Result for MeV-specific IgG.

^e F+, false positive; F-, false negative.

collected too early to obtain a positive result from the IgM assay.

DISCUSSION

This record shows the performance of direct and indirect diagnosis of measles in the setting of an outbreak in a restricted geographical area. The outbreak affected mostly either unvaccinated young adults over 20 years of age or children less than 15 months of age. The cause of this particular age distribution could be the fact that measles, mumps, and rubella vaccination at 15 months was introduced into Andalusia's general vaccination schedule in 1981, causing a decrease in the incidence of the illness in the following years as the number of the vaccinated children increased. This geographically restricted subset of susceptible young adults was not detected during a serological survey undertaken in 1996 in the whole region ("autonomous community") of Andalusia (9). This shows how an imported MeV genotype is able to produce an outbreak of more than 200 cases in areas with a high level of vaccine coverage and established surveillance programs, including serological surveys (5, 6).

Classically, measles diagnosis was based only on IgM detection, given the low sensitivity of the isolation. However, our results show that RNA detection by RT-PCR, using both urine and, especially, in pharyngeal exudate specimens, provides

more-sensitive markers. This could be due to early sampling in the cases studied. In this study most of the samples were taken at day 0 to 3 after onset of the rash and showed a higher detection rate for RNA in pharyngeal exudates (72.2%) than for specific IgM in serum (65.8%). It has been stated in publications that the IgM serum antibody level peaks within 2 days after onset of the rash (18). However, researchers in other studies found the RNA detection rate in throat swab specimens (98%) higher than that of MeV-specific IgM (83%) during the first 3 days after onset of the rash (17), in agreement with our results. Direct detection also enables diagnosis of cases of IgG-positive patients as reinfections after natural immunity or secondary vaccine failures which develop with no IgM production (Table 1).

A rate of 63.6% of our sera were positive by PCR, in contrast to another report that showed amplification in only 24% (16) of cases. Again, early sampling could account for this difference. Although RT-PCR performed with both pharyngeal exudate and urine specimens provides more-sensitive diagnostic markers, direct genomic amplification in serum must be attempted for genotyping, in the absence of more adequate samples. In our case, this made it possible to trace the index case of the outbreak.

RT-PCR was a more sensitive direct-detection technique than isolation in cell cultures, despite the high (44.2%) rate of

isolation from urine in comparison to the rates reported for other studies, 22% (17) and 18% (18). In spite of the fact that the genotype can be obtained through direct genomic amplification, viral isolation provides live virus, which is useful for a more extensive characterization of the strains involved in the outbreaks.

Most protocols for measles diagnosis included in active surveillance programs recommend urine and pharyngeal exudate sampling for virus recovery within the first 5 days after onset of the rash but also serum sampling for IgM diagnosis after the first week, to obtain optimal results for both viral isolation and IgM detection. Consequently, two patient visits are necessary to ensure a sensitive diagnosis. A single set of serum, pharyngeal exudate, and urine samples taken on the same day as the first clinical diagnosis is sufficient to obtain the most rapid and sensitive laboratory diagnosis, as well as full genetic characterization of the virus, if RT-PCR techniques are included in the protocols, in combination with IgM detection. Cases positive only by PCR should be confirmed by serology in a convalescent-phase serum if possible. Multiplex PCR will provide data on differential diagnosis with RUBV and B19V, without any additional effort. Finally, viral isolation will provide further characterization of the antigenic and phenotypic characteristics of the strain.

Thus, laboratory protocols used in the epidemiological surveillance of measles in the context of eradication programs should be reviewed in countries with access to genomic amplification technologies, considering the usefulness of RT-PCR.

ACKNOWLEDGMENTS

This scientific work has been supported by the Dirección General de Salud Pública and the Instituto de Salud Carlos III as part of the Consume and Health Ministry and by the Consejería de Salud of the Andalusian Community.

We thank Juan Carlos Sanz from the Regional Laboratory of Public Health of the Community of Madrid for his help in the statistical analysis. We also thank Pilar Balfagón, Ana Castellanos, Jesús de la Fuente, Irene González, Eulalia Guisasaola, Nieves Herranz, Paloma Lucas, Teodora Minguito, Isabel Pérez, Francisco Salvador, and Manuel Vera for their excellent technical assistance.

REFERENCES

1. Amela, C., I. Pachon, and F. de Ory. 2003. Evaluation of the measles, mumps and rubella immunisation programme in Spain by using a sero-epidemiological survey. *Eur. J. Epidemiol.* **18**:71–79.
2. Avellon, A., P. Perez, J. C. Aguilar, R. Lejarazu, and J. E. Echevarria. 2001. Rapid and sensitive diagnosis of human adenovirus infections by a generic polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* **92**:113–120.
3. Carlson, J., H. Artsob, M. Douville-Fradet, P. Duclos, M. Fearon, S. Ratnam, G. Tipples, P. Varughese, B. Ward, J. Sciberras, and the Working Group on Measles Elimination. 1998. Measles surveillance: guidelines for laboratory support. *Can. Commun. Dis. Rep.* **24**:33–44.
4. Casas, I., A. Tenorio, J. M. Echevarria, P. E. Klapper, and G. M. Cleator. 1997. Detection of enteroviral RNA and specific DNA of herpesviruses by multiplex genome amplification. *J. Virol. Methods* **66**:39–50.
5. Castillo, O., G. Rey, D. Pastor, J. Quintero, L. Suarez, E. Eguis, E. Eslait, M. Donado, X. Carreno, N. Ortiz, P. Hernandez, B. Sanabria, S. Penaloza, E. Pretelt, M. Cutha, N. Perez, M. Cabas, H. Oliveros, H. Pertuz, and L. Bruzon. 2002. [Measles outbreaks in Colombia, February–March 2002]. *Biomedica* **22**:219. (In Spanish.)
6. Centers for Disease Control and Prevention. 2002. Outbreak of measles—Venezuela and Colombia, 2001–2002. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **51**:757–760.
7. Centers for Disease Control and Prevention. 2005. Progress in reducing measles mortality—worldwide, 1999–2003. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **54**:200–203.
8. el Mubarak, H. S., M. W. Van De Bildt, O. A. Mustafa, H. W. Vos, M. M. Mukhtar, J. Groen, A. M. el Hassan, H. G. Niesters, S. A. Ibrahim, E. E. Zijlstra, T. F. Wild, A. D. Osterhaus, and R. L. De Swart. 2000. Serological and virological characterization of clinically diagnosed cases of measles in suburban Khartoum. *J. Clin. Microbiol.* **38**:987–991.
9. Gallardo, V., F. Camino, J. Garcia, M. A. Escalera, J. J. Sanchez, A. Cabrera, and J. M. Alvarez. 1999. Encuesta Seroepidemiológica De Andalucía. Consejería de Salud. Junta de Andalucía, Sevilla, Spain.
10. Griffin, D. E., and W. J. Bellini. 1996. Measles virus, p. 1267–1312. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 3rd ed., vol. 1. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.
11. Helfand, R. F., J. L. Heath, L. J. Anderson, E. F. Maes, D. Guris, and W. J. Bellini. 1997. Diagnosis of measles with an IgM capture EIA: the optimal timing of specimen collection after rash onset. *J. Infect. Dis.* **175**:195–199.
12. Mosquera, M. del Mar, F. de Ory, M. Moreno, and J. E. Echevarria. 2002. Simultaneous detection of measles virus, rubella virus, and parvovirus B19 by using multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **40**:111–116.
13. Mosquera, M. M., F. Ory, and J. E. Echevarria. 2005. Measles virus genotype circulation in Spain after implementation of the national measles elimination plan 2001–2003. *J. Med. Virol.* **75**:137–146.
14. Njayou, M., A. Balla, and E. Kapo. 1991. Comparison of four techniques of measles diagnosis: virus isolation, immunofluorescence, immunoperoxidase & ELISA. *Indian J. Med. Res.* **93**:340–344.
15. Ratnam, S., G. Tipples, C. Head, M. Fauvel, M. Fearon, and B. J. Ward. 2000. Performance of indirect immunoglobulin M (IgM) serology tests and IgM capture assays for laboratory diagnosis of measles. *J. Clin. Microbiol.* **38**:99–104.
16. Riddell, M. A., D. Chibo, H. A. Kelly, M. G. Catton, and C. J. Birch. 2001. Investigation of optimal specimen type and sampling time for detection of measles virus RNA during a measles epidemic. *J. Clin. Microbiol.* **39**:375–376.
17. Tischer, A., S. Santibanez, A. Siedler, A. Heider, and H. Hengel. 2004. Laboratory investigations are indispensable to monitor the progress of measles elimination—results of the German Measles Sentinel 1999–2003. *J. Clin. Virol.* **31**:165–178.
18. van Binnendijk, R. S., S. van den Hof, H. van den Kerkhof, R. H. Kohl, F. Woonink, G. A. Berbers, M. A. Conyn-van Spaendonck, and T. G. Kimman. 2003. 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.* **188**:898–903.