

ESTRATEGIAS DE DIAGNÓSTICO EN ESPAÑA

Juan Emilio Echevarría Mayo

Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

El virus del sarampión (VS) pertenece al género *Morbillivirus* de la familia *Paramyxoviridae*, al igual que otros virus patógenos para el hombre, como el virus de la parotiditis y los virus de la parainfluenza 2 y 4 (género *Rubulavirus*), los virus de la parainfluenza 1 y 3 (género *Paramyxovirus*) y el virus respiratorio sincitial (género *Pneumovirus*). Como todos los miembros de esta familia, tiene como genoma un RNA no segmentado y de polaridad negativa de 15.893 pares de bases que se recubre de proteínas para formar una nucleocápside de simetría helicoidal. Entre estas proteínas, la más abundante es la nucleoproteína (N), estando también presentes la fosfoproteína (P) y la RNA polimerasa RNA dependiente (L), que ha de estar presente en el virión ya que, al tratarse de un RNA de polaridad negativa, éste debe transcribirse en un mRNA como paso previo a la síntesis de cualquier proteína vírica y ninguna enzima celular es capaz de transcribir RNA. Ésta nucleoproteína se encuentra dentro de una envuelta lipoproteica en la que la parte lipídica procede de la célula huésped y las proteínas son aportadas por el virus, siendo éstas la hemaglutinina (H) y la proteína de fusión (F). Ambas dirigen la entrada del virus en las células, que se realiza por la interacción de H con un receptor celular, de naturaleza no del todo esclarecida, y la posterior fusión de la envuelta lipídica con la membrana celular a través de H y F, permitiendo el acceso de la nucleocápside al citoplasma celular. Trabando la nucleocápside y la envuelta se encuentra la

proteína matriz (M), que interacciona con ambas, dando consistencia al virión, el cual se presenta al microscopio electrónico como muy pleomórfico, abundando en las preparaciones las nucleocápsides libres procedentes de la ruptura de los viriones a causa de su gran fragilidad.

El VS accede al organismo a través del tracto respiratorio, invadiendo células epiteliales de los tractos superior e inferior. De allí pasan a ganglios linfáticos locales y al torrente sanguíneo, produciendo la viremia primaria, durante la cual el virus no circula libre, sino en el interior de los leucocitos y especialmente de los monocitos por los que tiene un marcado tropismo. Una vez alcanzados los órganos linfoides se multiplica hasta alcanzar gran número y producir una viremia secundaria masiva, que alcanza numerosos órganos, como piel, pulmón, hígado o riñón, excretándose por el tracto respiratorio y la orina. Desde un punto de vista clínico, el cuadro comienza con síntomas inespecíficos faríngeos y conjuntivales debidos a la replicación local, seguidos de fiebre coincidente con la viremia, a la que sucede al cabo de varios días el característico exantema, cuyo retraso con respecto al período febril radica en que es producido por un mecanismo inmunopatogénico que no solo requiere de la presencia de virus en piel, sino que debe esperar a que se haya producido la respuesta inmune del huésped, detectable por la presencia de anticuerpos, primero de tipo IgM y luego de

tipo IgG que, a la postre, perdurarán toda la vida confiriendo inmunidad a la infección. El tropismo del VS por células linfoides se traduce en una depleción transitoria de la inmunidad celular, detectable por la ausencia temporal de respuesta a ensayos de inmunidad celular como, por ejemplo el de la tuberculina, responsable de que el paciente quede susceptible de padecer infecciones secundarias, que son la causa de la mayoría de las graves complicaciones de la infección y de la importante mortalidad que lleva asociada en pacientes desnutridos y bajo condiciones higiénicosanitaria precarias. Además, el propio virus del sarampión puede producir complicaciones, entre las que destacan las neumonías y la encefalitis de cuerpos de inclusión en pacientes inmunodeprimidos, y la panencefalitis esclerosante subaguda, hepatitis, miocarditis o ceguera. Una de las complicaciones más frecuentes es la encefalitis post-infecciosa, que no se debe a la invasión del Sistema Nervioso Central por parte del virus, sino que es producida indirectamente por un mecanismo de tipo autoinmunitario aun no bien esclarecido.

El diagnóstico de la infección por el VS se basa en las dos aproximaciones clásicas del diagnóstico virológico: la detección directa de la presencia del virus por aislamiento en cultivo, detección de alguno de sus componentes en una muestra clínica, o la detección indirecta a través de la presencia de anticuerpos específicos en la sangre del paciente (serología). A continuación analizaremos cada una de ellas por separado para discutir finalmente la aportación de cada una de estas aproximaciones a la labor de erradicación del sarampión y su adecuada estrategia.

1. Diagnóstico serológico

Los métodos más clásicos se basaban en la detección de anticuerpos totales por técnicas como la inhibición de la hemaglutinación, la neutralización o la fijación del complemento. Mientras que las dos primeras detectan anticuerpos dirigidos fundamentalmente frente a

proteínas de la envuelta, fundamentalmente de tipo IgG y presentes de por vida tras la infección, la fijación del complemento detecta anticuerpos frente a componentes internos mucho menos duraderos, pero más útiles para el diagnóstico de la infección aguda. En cualquier caso, el diagnóstico por estas técnicas se basa en la detección de seroconversión o aumento significativo de título entre dos muestras seriadas, una tomada en fase aguda y otra quince días después, en fase de convalecencia, o en la detección de un título significativamente alto en una muestra única por fijación del complemento, lo cual ocurre en fase de convalecencia, sufriendo el diagnóstico un importante retraso. Este grave inconveniente fue superado por las técnicas de detección de IgM específica, fundamentalmente por enzoinmunoanálisis, que son las más utilizadas actualmente para un diagnóstico rápido y sencillo de la infección aguda por el VS.

2. Diagnóstico por detección directa del virus. Aislamiento

Durante la infección aguda, el VS está presente en sangre y se excreta abundantemente por vía respiratoria y por orina, siendo posible su aislamiento con fines diagnósticos en un sistema adecuado. Como en el caso de cualquier virus, dicho sistema consiste en un cultivo de células, susceptibles de infectarse por el VS. Dichas células susceptibles han sido de forma clásica cultivos primarios de riñón de mono que, sin embargo, en los últimos años han visto su uso muy restringido, tanto por razones éticas como por cuestiones de seguridad asociadas a graves accidentes ocurridos con virus de mono como el Marburg o el Ebola, que son letales para el hombre. No ha sido sencillo encontrar un sustituto adecuado de estas células y algunas de las líneas establecidas más usadas, como las Vero, ofrecen un rendimiento mucho menor. Sin embargo, recientemente ha sido usada una nueva línea linfóide consistente en linfocitos de mono transformados por el Virus de Epstein-Barr, llamada B95a, que parece ofrecer rendimientos similares a las del riñón de

mono primario y que, de hecho, es la recomendada por la OMS.

Independientemente de la línea utilizada para el aislamiento del virus, éste es un proceso lento, ya que el virus tarda en crecer semanas y, además, frecuentemente se requieren subcultivos en ciego. Este problema puede solucionarse acudiendo a las técnicas de cultivo rápido (shell-vial), en las que el uso de la centrifugación y de la detección por fluorescencia sobre las monocapas inoculadas permiten aislar el agente en unos días. Aun así, el rendimiento es escaso debido a la enorme labilidad del VS, que hace que frecuentemente llegue inactivado al laboratorio. Por ello, un transporte rápido y en condiciones adecuadas de mantenimiento y refrigeración es fundamental y un paso limitante en el proceso del aislamiento.

3. Diagnóstico por detección directa del virus. Detección de antígenos

Una aproximación rápida y sencilla es la detección del virus en células respiratorias o del sedimento urinario por inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales, técnica consistente en la obtención de las células contenidas en la muestra por centrifugación, su fijación a un portaobjetos y su tinción con un anticuerpo monoclonal frente a algún componente del virus marcado con fluoresceína (inmunofluorescencia directa), o bien con uno sin marcar seguido de una reacción adicional con un antiaéreo anti inmunoglobulina de ratón marcada con fluoresceína (inmunofluorescencia indirecta).

4. Diagnóstico por detección directa del virus. Detección de ARN vírico mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La introducción de esta técnica en el diagnóstico microbiológico hace unos años, está revolucionando este campo. Consiste en la amplificación de un fragmento del genoma vírico mediante dos oligonucleótidos

complementarios de secuencias del genoma vírico, que flanquean el fragmento a amplificar y una ADN polimerasa termoestable que, tras la repetición de ciclos térmicos de tres pasos de desnaturalización del genoma, hibridación de los oligonucleótidos y elongación del fragmento por la ADN polimerasa, permiten obtener millones de copias de cada genoma vírico presente en la muestra original. Finalmente, los fragmentos generados se detectan por electroforesis de ADN o hibridación con sondas específicas. En el caso de que, como ocurre con el VS, el genoma vírico sea un ARN, hay que convertirlo previamente a ADN mediante una transcriptasa inversa. La realización de una segunda amplificación sobre los fragmentos de la primera usando iniciadores internos (PCR sucesiva), permite incrementar notablemente la sensibilidad. Además, es posible mezclar iniciadores específicos de otros agentes haciendo posible el diseño de métodos múltiples que permiten realizar diagnóstico diferencial sin esfuerzo adicional. En nuestro laboratorio hemos puesto a punto uno que permite la detección simultánea de VS, virus de la rubéola y parvovirus B19, con exquisita sensibilidad. En resumidas cuentas, la PCR permite un diagnóstico en cuestión de horas con elevada eficacia.

5. Estudios complementarios de utilidad en el plan de erradicación del sarampión. Encuestas Seroepidemiológicas y caracterización de cepas

La consecución de la erradicación del sarampión depende fundamentalmente de la aplicación de una estrategia de inmunización adecuada, apoyada en una vigilancia epidemiológica que permita la evaluación de sus resultados. Para ello, son fundamentales las encuestas seroepidemiológicas encaminadas a conocer el nivel de inmunidad de la población, de forma que podamos centrar las actuaciones en los grupos de población que más contribuyen al sostenimiento de la circulación del virus. Además, en los estadios finales en

los que los brotes son ya esporádicos y localizados, es conveniente estudiar las cepas implicadas, a fin de conocer si su origen es autóctono o han sido importadas. Esto puede hacerse sin excesiva dificultad mediante la secuenciación de fragmentos cortos pero hipervariables del genoma vírico, como es uno de 450 nucleótidos de extensión que codifica para el extremo C-terminal de la nucleoproteína, que ha sido muy utilizado en este tipo de estudios y que recomienda la OMS en el marco del Plan de Erradicación del Sarampión. La secuenciación automática simplifica enormemente este tipo de estudios que antaño resultaban mucho más difíciles y trabajosos.

6. Estrategias diagnósticas en el marco del Plan de Erradicación del Sarampión

El laboratorio de virología debe cubrir tres necesidades dentro del Plan de Erradicación de sarampión. La primera es la de la confirmación de los casos diagnosticados por criterios clínicos, ya que las definiciones son muy generales y pueden abarcar casos producidos por otros agentes diferentes del VS. La consecuencia sería que, de no haber confirmación por parte del laboratorio, seguirían declarándose casos aún después de interrumpida la circulación del agente, de forma que nunca llegaría a ser declarado erradicado. Para este primer propósito, el diagnóstico serológico mediante detección de IgM específica cumple los criterios requeridos de eficacia, rapidez y sencillez. La situación actual en España, en cuanto a número de casos declarados, permitiría, el establecer un diagnóstico definitivo del agente en aquellos casos negativos para el virus del sarampión, completando el estudio con serologías para virus como el de la rubéola o el Parvovirus B19 u otros que se consideren oportunos.

Una segunda misión del laboratorio de virología es la realización de encuestas seroepidemiológicas, para lo cual los enzimo-

inmunoanálisis de detección de IgG resultan los más adecuados.

Finalmente, el tercer propósito del laboratorio de Virología es el de obtener cepas de virus sobre las que puedan realizarse estudios de Epidemiología Molecular tal y como indicábamos en el apartado anterior. Para ello ha de intentarse el aislamiento del virus en muestras clínicas adecuadas como exudados faríngeos tomados no más allá de cuatro días después del comienzo del exantema y orina hasta siete días después. Es conveniente intentarlo todos los casos esporádicos y en una representación de cada brote, hasta que se haya obtenido en alguno de ellos, ya que hay que tener en cuenta que el rendimiento es escaso y no siempre se va a poder aislar el agente. Sin embargo, no es absolutamente imprescindible aislar el virus completo, ya que el fragmento a secuenciar puede ser directamente amplificado de la muestra clínica por PCR. De esta forma, además de intentar el aislamiento, puede realizarse una PCR sobre las muestras utilizando iniciadores en zonas conservadas, para luego intentar la amplificación del fragmento variable a secuenciar. El uso de métodos múltiples puede permitir, sin esfuerzo adicional y de forma inmediata, el diagnóstico diferencial, no solo con los agentes para los que existe una buena serología, a los que antes hemos aludido, sino con otros para los que ésta no está disponible o resulta complicada, como es el caso de los enterovirus. El aislamiento no debería ser, sin embargo, abandonado, ya que la obtención de cepas vivas permite la realización de estudios adicionales de tipificación con anticuerpos monoclonales o neutralización, que pueden aportar información muy importante sobre la antigenicidad de las cepas.

En resumen, el papel del laboratorio de diagnóstico en el Plan de Erradicación del Sarampión ha de ser creciente según avancemos en sus objetivos, hasta resultar absolutamente imprescindible para poder declarar erradicada definitivamente la enfermedad.