

*INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL
“PEDRO KOURI”
DEPARTAMENTO DE VIROLOGIA*

***La vigilancia de laboratorio como
soporte fundamental del programa de
eliminación del sarampión, la rubeola y
la parotiditis en Cuba, 1988-2007***

*Tesis en opción al grado Científico de
Doctor en Ciencias Médicas
(Resumen)*

Autor: Dra. María de los Angeles Ribas Antúnez.

*Tutor: Prof. María Guadalupe Guzmán. Dr.Cs
Prof. Pedro Mas Lago. DrC.*

*Ciudad de La Habana
2010*

SÍNTESIS

Se presenta el papel del Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) en la vigilancia clínico epidemiológica de los virus del sarampión, rubeola y parotiditis (PRS) durante los años 1988 al 2007. Se muestra el desarrollo de algoritmos de trabajo a medida que se introdujeron técnicas y diversos tipos de muestras en el diagnóstico y se observa la disminución de los casos positivos a sarampión desde un 16% en 1988 a un 0,3% en 1993, cuando se confirmaron los dos últimos casos de esta enfermedad en el país. Se demuestra la presencia de resultados falsos positivos en el ELISA (Ensayo inmunoenzimático sobre fase sólida, siglas del inglés, Enzyme Linked Immnosorbent Assay) para la detección de anticuerpos de tipo IgM al virus del sarampión, siendo necesario tomar una segunda muestra para la confirmación de los casos por Inhibición de la Hemaglutinación (IH). La detección de la avidez de los anticuerpos de tipo IgG al virus de la rubeola, en las muestras de suero de los trabajadores cubanos involucrados en el brote del 2004, muestra un 88,2% de infección primaria al virus. Se confirman diferentes brotes de parotiditis a partir de 2004 en adolescentes y adultos jóvenes, encontrándose un 12,3%, 22,5% y 23% de positividad en los años 2005, 2006 y 2007 respectivamente. Al ser analizada la encuesta seroepidemiológica realizada en 1999, se halló una disminución en el nivel de los anticuerpos a sarampión y rubeola en la población de 6 a 10 años de edad. Los resultados de este trabajo, apoyaron la decisión de las autoridades de salud de incorporar al programa de inmunizaciones, la reactivación de la triple viral a los 6 años de edad y realizar una campaña de vacunación a la población entre 12 a 24 años, con esta misma vacuna.

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN	Pág.
I.1. Antecedentes.....	1
I.2. Hipótesis.....	3
I.3. Objetivos.....	3
I.4. Novedad Científica.....	3
I.5. Valor Teórico Práctico	3
I.6. Proyectos de Investigación.....	4
I.7. Publicaciones Científicas.....	4
I.8. Eventos Científicos.....	5
 II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
II.1. - Sarampión.....	9
II.1.1. Concepto.....	9
II.1.2. Historia.....	9
II.1.3. Agente Infeccioso.....	10
II.1.3.1. Clasificación.....	10
II.1.3.2. Resistencia y sensibilidad a los agentes físicos y químicos.....	11
II.1.3.3. Rango hospedero.....	11
II.1.4. Patogenia y patología.....	12
II.1.5. Respuesta inmune.....	12
II.1.6. Manifestaciones clínicas.....	13
II.1.6.1. Sarampión clásico.....	13
II.1.6.2. Sarampión modificado.....	13
II.1.7. Complicaciones.....	14
II.1.7.1. Sarampión atípico.....	14
II.1.7.2. Neumonía bacteriana.....	14
II.1.7.3. Neumonía de células gigantes.....	14
II.1.7.4. Encefalitis post Infecciosa Aguda.....	15
II.1.7.5. Encefalitis con cuerpos de inclusión.....	15
II.1.7.6. Panencefalitis Esclerosante Subaguda.....	15
II.1.8. Diagnóstico de laboratorio.....	15
II.1.8.1. Aislamiento e identificación viral.....	16
II.1.8.2. Diagnóstico serológico.....	16

II.1.8.3. Diagnóstico molecular.....	16
II.1.9. Epidemiología.....	17
II.1.9.1. Epidemiología molecular.....	17
II.1.10. Prevención y control.....	18
II.2. - Rubeola.....	19
II.2.1. Concepto.....	19
II.2.2. Historia.....	19
II.2.3. Agente Infeccioso.....	19
II.2.3.1. Clasificación.....	19
II.2.3.2. Resistencia y sensibilidad a los agentes físicos y químicos.....	20
II.2.3.3. Rango hospedero.....	20
II.2.4. Patogenia y patología.....	21
II.2.5. Respuesta inmune.....	21
II.2.6. Manifestaciones clínicas.....	22
II.2.6.1. Rubeola post natal.....	22
II.2.6.2. Síndrome de Rubeola Congénita	23
II.2.7. Complicaciones.....	23
II.2.8. Diagnóstico de laboratorio.....	23
II.2.8.1. Aislamiento e identificación viral.....	24
II.2.8.2. Diagnóstico serológico	24
II.2.8.3. Diagnóstico molecular.....	24
II.2.8.4. Diagnóstico de laboratorio del SRC.....	24
II.2.9. Epidemiología.....	25
II.2.9.1. Epidemiología molecular.....	25
II.2.10. Prevención y control.....	26
II.3. - Parotiditis.....	26
II.3.1. Concepto.....	26
II.3.2. Historia.....	26
II.3.3. Agente Infeccioso.....	27
II.3.3.1. Clasificación.....	27
II.3.3.2. Rango hospedero.....	28
II.3.4. Patogenia y patología.....	28
II.3.5. Respuesta inmune.....	29
II.3.6. Manifestaciones clínicas.....	29
II.3.7. Complicaciones.....	29
II.3.8. Diagnóstico de laboratorio.....	30
II.3.8.1. Aislamiento e identificación viral.....	30

II.3.8.2. Diagnóstico serológico	30
II.3.9. Epidemiología.....	31
II.3.9.1. Epidemiología molecular.....	31
II.3.10. Prevención y control.....	31
II.4. - Vigilancia de PRS.....	32
II.4.1. Definiciones.....	32
II.4.1.1. Definición de Sistema de Vigilancia Epidemiológica.....	32
II.4.1.2. Definición de Vigilancia de laboratorio.....	32
II.4.1.3. Definición de casos de sarampión, rubeola y parotiditis.....	32
II.4.1.4. Definición de eliminación y erradicación de una enfermedad.....	33
II.4.2. Funciones de la vigilancia de laboratorio.....	33
II.4.3. Indicadores de la vigilancia de laboratorio de PRS.....	34
II.4.4. Vigilancia integrada del sarampión, la rubeola y la parotiditis.....	34
II.4.5. Vigilancia de PRS en diferentes regiones del mundo.....	34
II.4.6. Vigilancia epidemiológica de PRS en Cuba	36
II.4.6.1. Vigilancia epidemiológica del sarampión.....	36
II.4.6.2. Vigilancia epidemiológica de la rubeola.....	37
II.4.6.3. Vigilancia epidemiológica de la parotiditis.....	37

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Producción de antígenos.....	39
III.1.1. Producción del antígeno de la parotiditis y el sarampión para la realización de las técnicas de IH, IFI y el SUMA.....	39
III.1.2. Producción del antígeno de rubeola para la realización de las técnicas de IH,IFI y el SUMA.....	40
III.2. Técnicas empleadas	40
III.2.1. Técnica IH para la detección de anticuerpos a los virus del sarampión, la parotiditis y la rubeola	40
III.2.2. SUMA para detección de anticuerpos totales al virus del sarampión.....	41
III.2.3. SUMA para la detección de anticuerpos totales al virus de la rubeola.....	42
III.2.4. ELISA para la detección de anticuerpos de tipo IgM al virus del sarampión.....	42
III.2.5. ELISA de captura para la detección de anticuerpos de tipo IgM al virus de la rubeola.	43
III.3. Colección, almacenamiento y envío al laboratorio, de las muestras de suero, exudado nasofaríngeo y orina.	44
III.4. Materiales y métodos específicos de cada estudio.....	45
III.4.1. Procedimientos establecidos en el laboratorio para la Vigilancia del sarampión, la rubéola y la parotiditis. Cuba 1988/2007.....	45

III.4.1.1. Métodos.....	45
III.4.2. Introducción del ELISA/IgM para el diagnóstico del Sarampión. Cuba 1995.....	45
III.4.2.1. Muestras serológicas.....	45
III.4.2.2. Técnicas Empleadas	45
III.4.2.2.1. ELISA indirecto para la detección de anticuerpos de tipo IgM al virus del sarampión	45
III.4.2.2.2. IFI para la detección de anticuerpos de tipo IgM a los virus del sarampión y la rubeola.	46
III.4.2.2.3. Detección de anticuerpos neutralizantes al virus del sarampión (micrométodo).	46
III.4.2.2.4. IFI para la detección de anticuerpos de tipo IgG al CMV, VHS, VCA y EA del VEB.	47
III.4.3. Vigilancia de laboratorio a los virus del sarampión, la rubéola y la parotiditis. Cuba 1988/2007.....	47
III.4.3.1. Muestras serológicas	47
III.4.3.2. Técnicas Empleadas.	48
III.4.4. Estudio de seroprevalencia de anticuerpos a PRS en una población comprendida en las edades entre 7 meses y 23 años. Cuba 1999.....	48
III.4.4.1. Muestras serológicas.	48
III.4.4.2. Datos para la colección de la muestra.	49
III.4.4.3. Técnicas Empleadas	49
III.4.5. Diagnóstico de un brote de rubéola. Cuba 2004.....	49
III.4.5.1. Muestras serológicas.....	49
III.4.5.2. Técnicas Empleadas	49
III.4.6. Determinación de la afección de los anticuerpos de tipo IgG en el suero de trabajadores cubanos involucrados en el brote de rubeola	49
III.4.6.1. Muestras serológicas.....	49
III.4.6.2. Técnicas Empleadas	49
III.4.6.2.1. ELISA para detección del IAR de los anticuerpos de tipo IgG al virus de la rubeola.	49
III.4.7. Diagnóstico de brotes de parotiditis. Cuba 2004/2007.....	51
III.4.7.1. Muestras Clínicas.....	51
III.4.7.2. Técnicas Empleadas	51
III.4.7.2.1. Aislamiento del virus de la parotiditis en muestras de exudado nasofaríngeo y orina.....	51
III.4.7.2.2. Técnica de TR-RCP para amplificar el genoma del virus de la parotiditis.....	51
III.4.7.2.2. 1. Extracción del ARN viral.	51
III.4.7.2.2. 2. Técnica de Transcripción Reversa – Reacción en Cadena	

de la Polimerasa (TR-RCP).....	52
III.5. Análisis estadístico.....	53
III.6. Consideraciones éticas de la investigación.....	53
IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
IV.1. Procedimientos establecidos en el laboratorio para la Vigilancia del sarampión, la rubéola y la parotiditis. Cuba 1988/2007.....	54
IV.1.1. Algoritmos de trabajo del laboratorio para el diagnóstico de PRS.....	54
IV.1. 2. Algoritmo de trabajo del laboratorio para el diagnóstico del SRC.....	56
IV.1.3. Algoritmo de trabajo del laboratorio para el diagnóstico de la parotiditis.....	57
IV.2. Introducción del ELISA/IgM para el diagnóstico del Sarampión. Cuba 1995.....	59
IV.3. Vigilancia de laboratorio al sarampión, la rubeola y la parotiditis. Cuba 1988/2007.....	61
IV.3.1. Vigilancia de laboratorio al sarampión. Cuba 1988/2007	61
IV.3.2. Vigilancia de laboratorio a la rubeola. Cuba 1988/2007.....	64
IV.3.3. Vigilancia de laboratorio a la parotiditis. Cuba 1988/2007.....	66
IV.4. Estudio de seroprevalencia de anticuerpos a PRS en una población comprendida en las edades entre 7 meses y 23 años. Cuba 1999	69
IV.5. Diagnóstico de un brote de rubéola. Cuba 2004.....	75
IV.6. Determinación de la avidéz de los anticuerpos de tipo IgG en el suero de trabajadores cubanos involucrados en el brote de rubeola	79
IV.7. Diagnóstico de brotes de parotiditis. Cuba 2004/2007.....	83
V. - CONSIDERACIONES GENERALES.....	89
VI. - CONCLUSIONES.....	93
VII. - RECOMENDACIONES.....	94
VIII. - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
IX. - ANEXOS	

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Antecedentes.

Cada año fallecen en el mundo 10 millones de niños menores de 5 años, siendo el 25% debido a enfermedades prevenibles por vacunas (OMS^b, 2008).

Antes de la introducción de la vacuna antisarampionosa en el programa de inmunizaciones en los años sesenta, casi todas las personas contraían esta enfermedad, fundamentalmente durante la niñez, presentándose cerca de 130 millones de casos y más de 2,5 millones de defunciones anualmente (OMS^a, 2006).

La parotiditis y la rubeola son consideradas como enfermedades leves, pero esta última tiene gran importancia para la salud pública, debido a que al producirse en las mujeres en el primer trimestre del embarazo, sus hijos desarrollan el Síndrome de Rubeola Congénita (SRC), naciendo más de 100 000 millones de niños con estas malformaciones en todo el mundo, cada año (OMS^a, 2006).

En 1994, los países de Las Américas decidieron llegar a la meta de eliminación del sarampión para el año 2000, produciéndose el cese de la transmisión endémica en 2002. Posteriormente en 2003, junto a la región Europea, se adoptó la medida de eliminar la rubeola y el SRC en 2010 y mantener además el control de la parotiditis, para lo cual era necesario implementar una vigilancia efectiva a nivel global y el compromiso político de lograr este objetivo (Hersh y cols., 2000; Anónimo^a, 2005; Anónimo^b, 2006; Anónimo^d, 2009).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las diferentes estrategias para la eliminación del sarampión en Las Américas, los países pertenecientes a las regiones del Sudeste Asiático, África, el Pacífico Occidental y el Mediterráneo Oriental, decidieron eliminar el sarampión entre el 2010 y el 2020, mientras que el alcance de la vigilancia de rubeola / SRC continuó siendo deficiente, ya que muchos de ellos no la incorporaron a su sistema de vigilancia de enfermedades transmisibles (Dayan y cols., 2008; OMS^e, 2010).

En Cuba, antes de 1986, se realizaron diversas campañas de vacunación contra el sarampión y la rubeola, pero a partir de este año es que se da inicio al programa de eliminación de PRS, al ser aplicada la triple viral, quedando establecida una vigilancia de laboratorio integrada a estos virus (MINSAP^a, 1995; MINSAP^{b-c}, 1999).

Se lograron avances en la eliminación de estas tres enfermedades y sus complicaciones en el país, llegando a reportarse los últimos casos de sarampión en 1993 y de SRC en 1989, sin embargo, se produjo un brote de rubeola en 2004 y de parotiditis ocurrieron varios desde el 2004 al 2007, en adolescentes y adultos jóvenes fundamentalmente, confirmados todos por el laboratorio (Valcarcel, 2007).

Se conoce que, una vez incorporada la vacuna viva atenuada contra PRS en los programas de inmunización de los países, se produce una disminución en la incidencia de estas enfermedades, sin embargo, las mismas continúan siendo una importante causa de morbilidad y mortalidad, produciéndose brotes por el acúmulo de susceptibles y la importación de los virus desde zonas endémicas (Anónimo^c, 2008; Castillo^a y Ruiz, 2009; Castillo^b y Ruiz, 2009).

La vacunación cambió la dinámica epidemiológica de las enfermedades infecciosas, trayendo como resultado una limitada persistencia de la inmunidad, además, la evidencia clínica mostró no ser suficiente para la confirmación, por lo que la vigilancia de laboratorio, comenzó a jugar un papel importante en la evaluación de la incidencia y severidad de estas enfermedades, así como en el monitoreo y verificación de la transmisión y el conocimiento del perfil de susceptibilidad de la población (De Melker y cols, 2003; OMS^a, 2006, Dayan y cols, 2008).

En Cuba, la incorporación del LNR del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK) a la vigilancia de PRS, permitió a través de los años, introducir técnicas en el diagnóstico para la confirmación de casos con sospecha clínica y epidemiológica, además de la realización de encuestas seroepidemiológicas para conocer el nivel de anticuerpos en la población y su capacidad de respuesta ante la exposición a estos agentes, así como realizar el diagnóstico de brotes, confirmar la transmisión y determinar la fuente geográfica de los mismos.

El estudio que se presenta, pretende mostrar el papel desempeñado por el laboratorio en el plan de eliminación de estas enfermedades, en el periodo comprendido desde 1988 al 2007.

I.2. Hipótesis.

La participación del laboratorio en el sistema de vigilancia del sarampión, la rubeola y la parotiditis, brinda la información necesaria para el establecimiento de las estrategias hacia el control y la eliminación de estas enfermedades en Cuba y América.

I.3. Objetivos.

General:

Participar en el perfeccionamiento del programa de eliminación del sarampión, la rubeola y la parotiditis en Cuba.

Específicos.

- 1.- Integrar la vigilancia de laboratorio al programa de eliminación de PRS en Cuba.
- 2.- Elaborar algoritmos de trabajo de laboratorio, para el diagnóstico de estas enfermedades.
- 3.- Determinar la seroprevalencia de anticuerpos a estos virus en la población cubana.
- 4.- Detectar y confirmar los brotes de PRS en el país.

I.4. Novedad Científica.

La vigilancia de laboratorio de PRS representa un pilar importante en el programa de eliminación de estas enfermedades en Cuba, sirviendo como soporte científico al logro de esta estrategia con una eficiencia alta.

A través de los años, el laboratorio ha sido responsable de la confirmación de los casos sospechosos empleando algoritmos y protocolos de diagnóstico validados y muestras adecuadas, siendo suficientemente sensible como para detectar casos importados y sugerir, a las autoridades de salud, adoptar modificaciones en el programa de vacunación nacional.

I.5. Valor Teórico y Práctico.

La confirmación de los casos por el laboratorio es crucial en todo sistema de vigilancia que tenga como objetivo la eliminación de una enfermedad infecciosa a través del programa de vacunación.

Durante estos años de estudio, el laboratorio jugó un importante papel en la vigilancia de PRS en Cuba, dando una respuesta rápida ante un caso sospechoso de alguna de estas patologías, facilitando las acciones oportunas ante cualquier evento.

Los estudios realizados aportan nuevos conocimientos al desarrollo de la vigilancia de laboratorio a estos virus, iniciada hace más de 10 años.

Los resultados presentados en este trabajo fueron objeto de 10 publicaciones científicas y el capítulo 68 del libro Microbiología y Parasitología Médicas. Tomo II. Paramixovirus y Rubeola (Premio de la Crítica Científica – Técnica 2001, Premio Anual de la Salud 2002 y Ponencia relevante del XIV Forum Nacional de Ciencia y Técnica 2003).

Por el trabajo desarrollado por el laboratorio en la vigilancia a sarampión, rubeola y parotiditis, se realizó en el año 2007 la acreditación del mismo por parte de la Organización Panamericana de la Salud y la Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS), como LNR por su eficacia y desempeño en la red de laboratorios que apoyan al programa de Inmunización de Las Américas.

I.6. Proyectos de Investigación.

- 1.- Proyecto Ramal de Enfermedades Transmisibles: Seroprevalencia de anticuerpos a sarampión, rubeola y parotiditis en una población de 0 a 23 años. 2002- 2003.
- 2.- Proyecto Ramal de Enfermedades Transmisibles: Aplicación de técnicas de Biología Molecular al diagnóstico del sarampión y la rubeola en Cuba. 2005- 2007.
- 3.- Proyecto Internacional: Eliminación de la infección por el virus del sarampión y la rubeola/SRC en Las Américas. 2000- 2010.

I.7. Publicaciones Científicas.

1. Galindo M, Santin M, Resik S, **Ribas MA**, Guzmán M et al: Measles Elimination in Cuba. Pan Amer. J Pub Healt. 1998; 4 (3). 171 – 177.
2. **Ribas MA**, Arocha Y, Toraño I, Rodríguez C. Inmunováloração de IgM em amostras suspeitas de sarampião clinicamente. Rev Cub Med Trop. 1998; 50 (2): 105 – 109.
3. **Ribas MA**, Ustari C, Torres G et al: Presencia de anticuerpos al virus del sarampión en pacientes con hemopatías malignas. Rev. Cub. Med. Trop. 2000; 52 (3): 211 -214.
4. **Ribas MA**, Valdes O, Valdivia A: Paramixovirus y Rubeola. En Microbiología y Parasitología Médicas. Tomo II. Cap. 68. 247-272. 2001.

5. Cancio R, Torres G, **Ribas MA**, Salazar I, Galindo M, Valcárcel M, García D, Rodríguez C, Tejeiro Y. Vigilancia serológica de los virus de la rubeola, Sarampión y Parotiditis. Cuba 1992 - 2002. Revista Latinoamericana de Microbiología. 2002; 44(4). Suplemento.
6. **Ribas MA**, Torres G, Cancio R, Salazar I, Galindo M, Valcárcel M, García D, Rodríguez C, Tejeiro Y. Encuesta serológica a sarampión, rubeola y parotiditis en personas de 7 meses a 23 años, durante 1997-98. Revista Latinoamericana de Microbiología. 2002; 44 (4). Suplemento.
7. **Ribas MA**, Galindo M, Valcarcel M, et al: Role of the virology diagnostic laboratory in the surveillance of Rubella Virus. Cuba 1988-2000. Vaccine. 2004; 22 (31): 4287 – 90.
8. **Ribas MA**. Brote de Rubeola en Cuba/2004. Informe Técnico. IPK – 20 / 2004.
9. **Ribas MA**, Galindo M, Valcárcel M, García D, Rodríguez C, Tejeiro Y. Vigilancia seroepidemiológica a los virus del sarampión, rubeola y parotiditis en una población de 7 meses a 23 años. Rev Cub Med Trop. 2004; 56 (3): 192 -6.
10. Acosta G, **Ribas MA**, Tejero Y, Vazquez S, Piedra D. Normalización de un ELISA para detección de anticuerpos de tipo IgM al virus de la parotiditis. Rev Cub Med Trop. 60(3). 2008.

I.8. Eventos Científicos.

1. Seminario Latinoamericano de Infectología, CUBA, 1992.
 - Vigilancia seroepidemiológica de la vacuna triple viral. Resik S, **Ribas MA**, Mas P., Rosario D.
2. IV Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología y I Congreso de Medicina Tropical. Cuba. 1993.-
 - Encuesta serológica nacional de la vacuna triple viral en una población de 0 a 4 años. S. Resik, P. Mas, **Ribas MA**, G. Guzmán, M. Galindo, J. Bravo, C. Rodríguez.
 - Estudio de casos seronegativos a sarampión mediante la técnica de la hemaglutinación y su comparación con la neutralización. **Ribas MA**, S. Resik, P. Mas, G. Guzmán, I. Toraño.
3. IV Congreso Nacional de Higiene y Epidemiología y I Congreso Nacional de Infectología. Cuba. 1996.
 - La serovigilancia del sarampión, Rubeola y Parotiditis. Simposio Conferencista. **Ribas MA**.

- Detección de IgM en casos sospechosos de sarampión procedentes de la vigilancia seroepidemiológica de sarampión, rubeola y parotiditis. **Ribas MA**, Y. Arocha, I. Toraño, C. Rodríguez, S. García.
- 4. V Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical. V Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. II Congreso Cubano de Medicina Tropical Congreso 60 Aniversario del IPK. Cuba. 1997.
 - Inmunovaloración de IgM en muestras clínicamente sospechosas de sarampión. **Ribas MA**, Arocha Y, Torano I, Rodriguez C.
- 5. Biotecnología Habana 97. Diciembre 1-7. 1998.
 - Seropositividad al virus de la rubeola después de la vacunación con la triple viral. Cuba 1988/1995. **Ribas MA**, Torres G, Rodríguez C, et al.
- 6. I Congreso Nacional de Inmunología y III Jornada Nacional de Inmunología. Habana. Cuba. Diciembre 1998.
 - Prevalencia de anticuerpos al virus de la parotiditis. 1988-1997. **Ribas MA**, García D, Rodríguez C, Tejero Y et al.
 - Presencia de anticuerpos al virus del sarampión en un grupo de pacientes con hemopatías malignas. **Ribas MA**, Ustaris C, Torres G, et al.
- 7. Biotecnología. Havana 99.
 - Detección de anticuerpos al virus del sarampión en pacientes con hemopatías malignas. **Ribas MA**, Ustaris C, Torres G, García D, Tejero Y, Rodríguez C.
- 8. XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología (ALAM), V Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, III Congreso de Medicina Tropical. 11-15 Noviembre 2002. La Habana, Cuba.
 - Vigilancia serológica de los virus de la rubeola, Sarampión y Parotiditis. Cuba 1992-2002. Cancio R, Torres G, **Ribas MA**, Salazar I, Galindo M, Valcárcel M, García D, Rodríguez C, Tejeiro Y.
 - Encuesta serológica a sarampión rubeola y parotiditis en personas de 7 meses a 23 años, durante 1997-98. **Ribas MA**, Torres G, Cancio R, Salazar I, Galindo M, Valcárcel M, García D, Rodríguez C, Tejeiro Y.

9. 6to Congreso Latinoamericano de Inmunología. 3er Congreso Cubano de Inmunología 9-13. Diciembre 2002.
 - Vigilancia serológica de los virus de la rubeola, Sarampión y Parotiditis. Cuba 1992-2002. Cancio R, Torres G, **Ribas MA**, Salazar I, Galindo M, Valcárcel M, García D, Rodríguez C, Tejeiro Y.
10. Joven Ciencia 2005.
 - Programa de eliminación de sarampión, parotiditis y rubeola en Cuba. Estudios de laboratorio. García D, **Ribas MA**, Acosta G, Tejero Y, Rodríguez C.
11. Reunión Grupo Técnico Asesor del PAI. Ciudad Guatemala. 2006.
 - Investigaciones de laboratorio para monitorear el proceso de eliminación de la rubeola. Cuba 1988 /2005. **Ribas MA**, Acosta G, Galindo M, Valcárcel M, Guzmán M, Garcia D, Tejero Y, Piedra D.
 - Brote de Rubeola. Cuba año 2004. Valcárcel M, Urgelles R, Galindo M, Guzmán G, **Ribas MA**.
12. VIII Congreso Centroamericano y del Caribe de Parasitología y Medicina Tropical. Habana 2007.
 - Investigaciones de laboratorio para monitorear el proceso de eliminación de la rubeola. Cuba 1988 /2005. **Ribas MA**, Acosta G, Galindo M, Valcárcel M, Guzmán M, Garcia D, Tejero Y, Piedra D.
 - Normalización y aplicación de un ELISA de captura para la detección de anticuerpos de tipo IgM al virus de la parotiditis. **Ribas MA**, Acosta G, Galindo M, Valcárcel M, Guzmán M, Garcia D, Tejero Y, Piedra D.
13. 2do Taller sobre Técnicas de Laboratorio para el Aislamiento y la Detección del Virus de la Rubeola y Sarampión. 2-6 de Julio, 2007, INDRE, Ciudad de México.
 - Experiencia del Laboratorio Nacional y el estado actual del sistema de vigilancia virológica del sarampión y rubeola. Cuba. **Ribas MA**.
14. XXV Conferencia Científica del CIMEQ y XX Jornada de Enfermería y Tecnólogos de la Salud. 25 y 26 de Marzo. 2008. CIMEQ. La Habana. Cuba.

- ELISA de Captura para la detección de anticuerpos de tipo IgM al virus de la parotiditis. Tejero Y, Piedra D, Cordero Y, Acosta G, **Ribas MA.**
- Diagnóstico de la rubeola en Cuba. Estudios de laboratorio. Piedra D, Tejero Y, Cordero Y, Acosta G, **Ribas MA.**
- 15. XXVI Conferencia Científica del CIMEQ y XX Jornada de Enfermería y Tecnólogos de la Salud. 25 y 26 de Marzo. 2009. CIMEQ. La Habana. Cuba
 - Identificación de infección primaria y secundaria al virus de la rubeola mediante la detección de la avidez de la IgG en suero. Tejero Y, Piedra D, Cordero Y, Acosta G, **Ribas MA.**
- 16.- XVIII Reunión del Grupo Técnico Asesor sobre Enfermedades Prevenibles por Vacunación. San José. Costa Rica. 24-26/Agosto/2009. **Ribas MA.**
- 17.- Advanced Vaccinology Course. Annecy, Francia. 10-22/mayo/2010. **Ribas MA.**

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. Sarampión

II.1.1. Concepto.

El sarampión es una enfermedad infectocontagiosa caracterizada por fiebre, coriza, tos y conjuntivitis, seguida por la aparición de una erupción maculopapular, cuya presencia produce una mortalidad alta, en una población que no estuvo expuesta al virus con anterioridad (Mason, 1995).

II.1.2. Historia.

Las primeras descripciones de esta enfermedad se le atribuyen a Abu Berr, un médico que vivió en la antigua Persia, conocido también como Rhazes de Bagdad, el cual llamó al sarampión hasbah, lo que en árabe significa “erupción” y la distinguió de la viruela, considerándola como una enfermedad menos severa. En 1670, Thomas Sydenhams describió la ocurrencia de un brote de sarampión en Londres, proporcionando una imagen más precisa de la enfermedad, llamando la atención sobre la severidad de la misma en el adulto y del peligro de las complicaciones respiratorias (Griffin, 2007).

Los conocimientos sobre esta patología aumentaron con las observaciones del médico danés Peter Panum, el cual asistió a personas infectadas en una epidemia en las islas Faroe en 1846. Panum confirmó que el sarampión era una enfermedad contagiosa y que se transmitía directamente por el contacto entre las personas, definió los 14 días de período de incubación y demostró que los pacientes se volvían más infecciosos al final del período prodrómico cuando comenzaba a salir la erupción (Oxman, 1997).

En 1883, Hisch describió el impacto devastador de la infección por este virus en la población de las islas Fiji, confirmando las observaciones realizadas por Panum y concluyendo que la infección desaparecía cuando no había grupos de susceptibles (Ofcansky, 1984). Ya en 1954, Enders y Peebles reportaron el aislamiento del virus en células de riñón de mono Rhesus de la sangre de un paciente con sarampión agudo y describieron las características de su efecto citopático (ECP).

La presencia del sarampión en Las Américas, se debió a la colonización realizada por los europeos, lo que provocó aproximadamente 56 millones de muertes. En el siglo XVII, los aztecas y otras civilizaciones indias fueron desvastadas por las epidemias de esta enfermedad (Griffin, 2007).

II.1.3 Agente Infeccioso.

II.1.3.1 Clasificación.

El virus del sarampión es un miembro de la familia *Paramixoviridae*, género *Morbillivirus*, orden *Mononegavirales*. Es pleomórfico, generalmente esférico, que mide de 120 a 150 nanómetros (nm) de diámetro y tiene un peso molecular de $4,5 \times 10^6$ daltons (Da). Presenta una doble capa lipídica que envuelve a la nucleocápside helicoidal compuesta de Ácido Ribonucleico (ARN) y proteína, con 15 000 a 19 000 nucleótidos, teniendo en su extremo 3' alrededor de 50 nucleótidos y en el 5' de 50 a 161 nucleótidos, estas regiones son esenciales para la transcripción y replicación y flanquean los seis genes del virus (Bellini y cols, 1994; Griffin, 2007).

Se consideró por mucho tiempo como un virus monotípico antigénica y genéticamente estable, sin embargo, tiene cierto grado de variabilidad, la cual fue descrita en los productos genéticos de la nucleoproteína (N), proteína de la matriz (M), hemaglutinina (H) y la proteína de fusión (F), con el uso de anticuerpos monoclonales y más recientemente con el análisis de la secuencia nucleotídica del Ácido Desoxirribonucleico complementario (ADNc)(Griffin, 2007).

El genoma ARN es de cadena simple no segmentada y de polaridad negativa, no infeccioso, que codifica para seis proteínas estructurales. La caracterización genética del virus salvaje del sarampión se centró en el estudio de los genes que codifican para las proteínas H y N, que contienen un 8% de variabilidad nucleotídica (Rota y Bellini, 2003). El gen F es casi invariable, con sólo tres cambios reconocidos en el código, en contraste, la secuencia nucleotídica del gen H es muy variable, la mayoría de estos cambios aminoacídicos se encuentran entre los residuos 167 y 241, donde se localizan los cinco sitios de glicosilación (Wild, 1997; Ratnam y cols, 2000).

Dos glicoproteínas diferentes se proyectan en la envoltura, la H de 78 - 80 kilodaltons (kDa) y la proteína F, de 41-60 kDa, las cuales son necesarias para la unión del virus a la membrana celular, ambas tienen de 15 a 16 nm de longitud e interactúan con la proteína M (37 k Da) y esta a su vez con la nucleocápside para participar en la maduración viral. La nucleocápside helicoidal, consiste de cerca de 2 500 copias de N (60 kDa) unidas al genoma ARN, junto a un pequeño número de copias de fosfoproteína (P/72 kDa) y de la polimerasa (L/210 kDa). La nucleocápside tiene una estructura helicoidal con un diámetro de 17 a 18 nm (Figura 1) (Griffin, 2007).

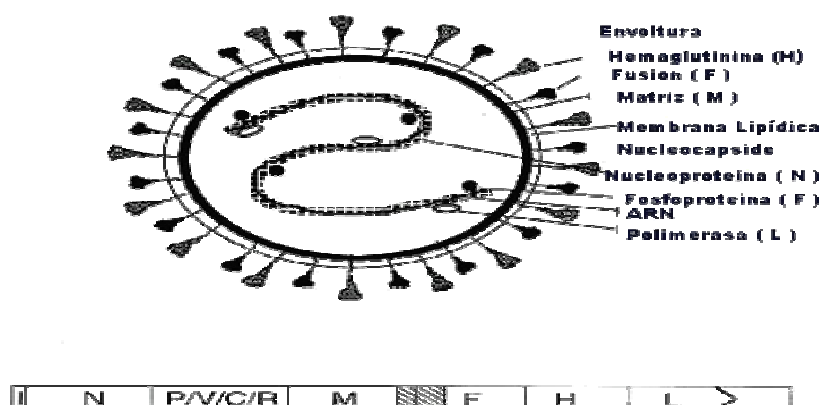


Figura 1. Genoma del virus del sarampión. Tomado de Fields, Virology, 2007.

II.1.3.2. Resistencia y sensibilidad a los agentes físicos y químicos.

El virus del sarampión es lábil al calor, se inactiva a 56⁰C durante 30 minutos (min). La infectividad disminuye en un 50% cuando se mantiene a 37 ⁰C por dos horas, también se inactiva cuando se expone a la luz ultravioleta y en presencia de solventes orgánicos como el éter, alcohol y fenol. Es estable desde pH 5,0 – 10,5, se preserva a menos 70 ⁰C y a 4 ⁰C varios meses en un medio que contiene proteínas (Bellini y cols, 1994).

II.1.3.3. Rango hospedero.

El hombre es el único hospedero natural para el virus del sarampión, pero también los primates no humanos se infectan experimentalmente con cepas del virus salvaje. Hasta el momento no se describen otros mamíferos susceptibles, aunque varias cepas fueron adaptadas a crecer en roedores después de pases sucesivos en animales recién nacidos. Estas cepas no produjeron una infección aguda como en el humano, pero sirvieron como modelo para el estudio de infecciones neurológicas (Mason, 1995).

Los cultivos primarios de riñón humano y de mono son muy sensibles a la infección con este virus, empleándose para ello las células linfoides y linfoblastoides humanas, pulmón embrionario, conjuntiva, intestino, piel, músculo, etc. El fibroblasto de embrión de pollo, el amnios humano, así como las células de línea continuas como las VERO (Riñón de mono verde africano, siglas del inglés African green monkey kidney cells) y las HeLa (Cáncer Cervical, siglas del inglés, Cervical cancer), permiten también el crecimiento del virus (Bellini y cols, 1994).

En el año 1991, las células de línea procedentes de linfocitos de monos marmoset infectados con virus Epstein Barr (VEB)(B95a), fueron reportadas como de alta sensibilidad para el aislamiento. Más recientemente, la línea celular VERO/hSLAM, es la que se recomienda para el aislamiento del sarampión, estas células tienen una sensibilidad similar a las B95a, pero no están crónicamente infectadas con el VEB, por lo que no se consideran un material infeccioso. La replicación viral produce un ECP característico que incluye la formación de sincitios y la producción de cuerpos de inclusión eosinofílicos intranucleares e intracitoplasmáticos (Kobune y cols, 1991; Rota y cols, 2009).

II.1.4 Patogenia y patología.

La infección con el virus del sarampión, produce una de las enfermedades transmisibles de mayor contagio que se conoce. El virus se disemina a través de aerosoles y sólo una pequeña cantidad se requiere para infectar a un individuo susceptible (Naniche, 2009).

Realiza su multiplicación a nivel del aparato respiratorio y se disemina a los ganglios linfáticos regionales, produciéndose una viremia primaria con infección de otros órganos linfáticos. De 5 a 7 días después, ocurre una segunda viremia con diseminación a múltiples órganos donde se incluyen la piel, riñón, aparato gastrointestinal e hígado, en los cuales se replica en las células endoteliales, epiteliales, monocitos y macrófagos y va acompañada de linfopenia. La presencia del virus en los sitios linforreticulares, produce hiperplasia linfoide y células gigantes multinucleadas (Bellini y cols, 1994; Mason, 1995; Griffin, 2007; Naniche, 2009).

II.1.5. Respuesta inmune.

El sarampión produce inmunosupresión transitoria en los niños, la cual puede persistir durante varios meses y contribuye al aumento de la susceptibilidad a las infecciones secundarias (Kanra y cols, 2001; Naniche, 2009).

Antes de producirse una inmunidad específica contra este virus, se desarrolla una respuesta inmune no específica que incluye la activación de las células asesinas naturales y la producción de interferón (IFN) α y β , lo que contribuye al control de la replicación viral durante el periodo de incubación (Griffin y cols, 1994).

Los niveles plasmáticos de las formas solubles de los receptores celulares de las células T (CD4, IL-2 y β 2 Microglobulina) son altos, igual que ciertas citoquinas producidas por estas células (IL-2, IL-4 y IFN γ). Los linfocitos T CD8⁺ pueden ser detectados en la sangre y en los lavados broncoalveolares, persistiendo

meses después de la infección; los T CD4⁺ proliferan durante el período de erupción y los CD4s se elevan y permanecen de esta manera por varias semanas (Rima y Duprex, 2006; Naniche, 2009).

Los anticuerpos de tipo IgM se detectan al inicio de la infección y persisten durante un período de 6 a 9 semanas. Al final de la erupción se producen anticuerpos de tipo IgG1, que son transportados a través de la placenta; además de los IgG4 y la IgA secretoria. La proporción de anticuerpos contra las proteínas específicas, van dirigidos fundamentalmente contra la proteína N y la ausencia de los mismos es un indicador de seronegatividad. Los anticuerpos neutralizantes contra las proteínas H y F del virus, están dirigidos contra el poder infectante del mismo (Griffin y cols, 1994).

II.1.6. Manifestaciones clínicas.

II.1.6.1. Sarampión clásico.

Aproximadamente de una semana a 10 días después de la exposición al virus, se producen coriza, tos, conjuntivitis y fiebre. Este estado prodrómico progresa en 3 ó 4 días, al cabo de los cuales se intensifican todos los síntomas y aumenta la fiebre. Durante este tiempo comienzan a hacerse visibles en la mucosa de la boca, entre el 50 – 90 % de los casos, las manchas de Koplik, signo patognomónico de la enfermedad, las cuales son pequeñas manchas rojas brillantes e irregulares (1 a 3 mm), que tienen una depresión blanco azulosa en su centro y se encuentran situadas en la mucosa opuesta a los molares, proporcionando un diagnóstico temprano de la enfermedad (Lee y cols, 2005). A partir del cuarto o quinto días, los síntomas se intensifican, acompañándose de un incremento en la fiebre con la aparición de una erupción maculopapular que aparece primeramente en la cara y detrás de las orejas, para luego diseminarse en forma centrípeta al tronco y las extremidades, posteriormente la erupción disminuye y se resuelve en forma descamativa (Mason, 1995; Lee y cols, 2005).

En el sarampión no complicado, la fiebre puede ser de 39 a 40 °C en el momento de la erupción, para luego disminuir al tercer o cuarto días (Rima y Duprex, 2006).

II.1.6.2. Sarampión modificado.

Aparece en las personas parcialmente inmunizadas, como son aquellas que recibieron inmunoglobulinas después de la exposición al virus, niños con anticuerpos maternos residuales y personas que perdieron la inmunidad después de ser vacunadas o infectadas naturalmente. Este tipo de sarampión es más leve que el clásico, pero el período de incubación se prolonga hasta 21 días, los pródromos pueden o no estar presentes, la fiebre es leve, puede o no haber manchas de Koplik y

cuando estas aparecen, sólo hay un pequeño número que rápidamente desaparece, la erupción dura poco y es muy atenuada. Los pacientes que padecen este tipo de sarampión, es muy raro que transmiten la enfermedad a otros individuos (Griffin, 2007).

II.1.7 Complicaciones.

II.1.7.1. Sarampión atípico.

El cuadro de sarampión atípico severo se observa en las personas que recibieron la vacuna inactivada con formalina y posteriormente se pusieron en contacto directo con el virus salvaje (Griffin, 2007).

La sintomatología está constituida por fiebre alta, cefalea, mialgias, dolor abdominal, anorexia, tos no productiva y disnea, apareciendo posteriormente una erupción que comienza por las palmas de las manos y plantas de los pies para después diseminarse de forma centripeta a las extremidades proximales, tronco y cara. No hay manchas de Koplik (Ratnam y cols, 2000).

Todo este cuadro va acompañado de neumonía con un infiltrado intersticial, consolidación pulmonar y muchos de los casos reportados presentan derrame pleural, adenopatías hiliares y lesiones parenquimatosas que pueden persistir años después de la desaparición de la infección aguda (Griffin, 2007).

Las manifestaciones atípicas encontradas, son el resultado de la respuesta inmunopatológica que aparece al combinar elementos de hipersensibilidad retardada con una reacción de Arthus (Griffin, 2007).

II.1.7.2. Neumonía bacteriana.

Esta patología es la responsable de aproximadamente el 60% de las muertes asociadas con sarampión. Resulta de una infección bacteriana sobreañadida y se sospecha cuando un paciente con sarampión, desarrolla manifestaciones respiratorias con un incremento de la fiebre. Esta neumonía responde rápidamente al tratamiento con antibióticos (Griffin, 2007).

II.1.7.3. Neumonía de células gigantes.

Los niños y adultos que presentan una inmunidad deficiente mediada por células, pueden desarrollar una infección al virus del sarampión generalmente severa y progresiva, cuyo curso puede ser fatal. La manifestación clínica frecuentemente encontrada es la neumonía de células gigantes, la cual se caracteriza por una insuficiencia respiratoria creciente que comienza 2 ó 3 semanas después de la exposición al virus, desarrollándose una neumonía intersticial progresiva con células gigantes multinucleadas a todo lo largo del epitelio traqueobronquial y alveolar; siendo la

mortalidad de alrededor de un 70% en pacientes con patologías oncológicas y de un 40% en personas infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Bronzwaer y de Groot, 1997).

II.1.7.4. Encefalitis Post Infecciosa Aguda (EPIA).

Es una enfermedad autoinmune desmielinizante, asociada a una respuesta inmune a la proteína básica de la mielina que se presenta en alrededor de 1:1 000 casos. Las personas que sobreviven a esta patología, a veces padecen de alteraciones mentales permanentes o discapacidad física y el mecanismo por el cual se relaciona con la infección por el virus del sarampión, aún no está bien definido (Ota y cols, 2005).

II.1.7.5. Encefalitis con Cuerpos de Inclusión (ECI).

Se puede presentar en pacientes inmunocomprometidos infectados con el virus del sarampión y puede aparecer sola o acompañada de una neumonía de células gigantes.

Los síntomas neurológicos aparecen de 1 a 6 meses después de la exposición al virus, generalmente no presentan fiebre, el estudio del líquido cefalorraquídeo (LCR) es normal y el electroencefalograma (EEG) presenta alteraciones no específicas. La progresión es rápida y la mayoría de las muertes se producen entre 6 a 8 semanas de iniciado el cuadro. La mortalidad excede el 85% (Ota y cols, 2005).

II.1.7.6. Panencefalitis Esclerosante Subaguda (PEES).

Es una complicación tardía con una incidencia de aproximadamente 1: 100 000 casos. El inicio de los síntomas es insidioso y aparece después de 5 a 15 años de la infección con el virus del sarampión. Se caracteriza por deterioro mental progresivo, movimientos involuntarios, rigidez muscular y coma. La presencia de anticuerpos al virus del sarampión es elevada en el suero y en el LCR y se encuentran virus defectuosos en las células gliales y las neuronas (Bonthius y cols, 2000; Yilmaz y cols, 2005).

II.1.8. Diagnóstico de laboratorio.

El sarampión clásico se diagnostica de acuerdo a las características de las manifestaciones clínicas que se presentan, así como a las condiciones epidemiológicas existentes. La ayuda del laboratorio es fundamental cuando aparece un caso de sarampión atípico y modificado, así como cuando

encontramos un índice alto de sospecha de neumonía o encefalitis producidas por el virus en pacientes inmunocomprometidos (Kanra y cols, 2001).

El diagnóstico diferencial de esta enfermedad, se realiza con aquellas patologías que producen erupción tales como la infección por enterovirus, rubeola, dengue, parvovirus B19, herpes 6, eritema medicamentoso, entre otras (Kobune y cols, 1991; Bellini y cols, 1994).

II.1.8.1. Aislamiento e identificación viral.

Para el aislamiento del virus en cultivo de células son necesarias muestras de exudado nasofaríngeo y conjuntival, sangre, orina y material de necropsia, cuando la situación sea especial. Las muestras deben ser recogidas en la fase aguda de la enfermedad, cuando el virus se encuentra en altas concentraciones y deben ser refrigeradas a menos 20 °C y enviadas al laboratorio en un período de 48 horas (Bellini y cols, 1994).

A través de la prueba de la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), se realiza la identificación del aislamiento obtenido en los cultivos inoculados (Smaron y cols, 1991; El Mubarak y cols, 2000).

II.1.8.2. Diagnóstico serológico.

Para el diagnóstico de sarampión se emplean fundamentalmente los estudios serológicos. Durante la infección primaria, los anticuerpos son detectables entre el primer y tercer día de iniciada la erupción, alcanzando su valor máximo de 2 a 4 semanas después.

Las pruebas de IH, neutralización (Nt), ELISA y la IFI, pueden emplearse para medir anticuerpos contra este virus. La IH fue la más ampliamente empleada hasta la introducción del ELISA, que permite la detección de anticuerpos del tipo IgG, de la avidéz de estos anticuerpos, la IgM y la IgA (El Mubarak y cols, 2000; Ratnam y cols, 2000; Griffin, 2007).

La campaña de eliminación del sarampión requiere de pruebas apropiadas para ser empleadas en lugares de difícil acceso, para lo cual se utilizan muestras como la saliva y la sangre colectada en papel de filtro, que facilitan la realización del diagnóstico (Wild, 1997; Samuel y cols, 2003).

II.1.8.3. Diagnóstico molecular.

La RCP y la hibridación molecular son métodos que se emplean en la detección del ARN de este virus, sobre todo en estudios de epidemiología molecular, pero estas técnicas no están consideradas dentro del diagnóstico de rutina de la enfermedad (El Mubarak y cols, 2005).

II.1.9. Epidemiología.

El sarampión se considera como una de las enfermedades infecciosas transmisibles que produce mayor número de personas infectadas, se estima que el 76% de los susceptibles expuestos se contagian. Su distribución es mundial, aparece al final del invierno y principios de la primavera, no existe reservorio animal y no hay evidencias de latencia o de infección persistente (Griffin, 2007).

El principal modo de transmisión es a través de las vías respiratorias, por el contacto de individuos susceptibles con personas infectadas que se encuentran en el estadio catarral de la enfermedad. El riesgo de transmisión se incrementa mientras más frecuente, prolongado e íntimo sea el contacto del susceptible con la persona infectada (Rima y Duprex, 2006).

En los países desarrollados, la ausencia de brotes de la enfermedad por el uso de la vacuna, condujo a la aparición de los casos en los niños de 5 a 9 años de edad y la mayoría de los riesgos de complicación y mortalidad son en edades inferiores a 15 años y en el adulto joven. En los subdesarrollados, más del 50% de los casos ocurren en niños menores de dos años, debido a la rápida pérdida de los anticuerpos maternos en este grupo de edad, a que la intensidad de exposición a la infección es mayor debido al tamaño familiar y a las prácticas sociales que se realizan, así como a que en los niños con malnutrición, la excreción del virus es más prolongada (Begue, 2001; Elliman y Sengupta, 2005).

No es frecuente la mortalidad por sarampión bajo condiciones aceptables de nutrición y salud. La muerte ocurre por la aparición de complicaciones de tipo respiratorias y neurológicas y en personas inmunocomprometidas y en el caso del embarazo, se produce un aumento de la probabilidad de partos prematuros, abortos espontáneos, bajo peso al nacer, pero no da lugar a malformaciones congénitas (Kamaci y cols, 1996).

II.1.9.1. Epidemiología molecular.

Pequeñas diferencias se encuentran entre las cepas vacunales independientemente del origen geográfico del virus parental. Los estudios de estas cepas, separan al virus del sarampión en 8 grupos designados como A, B, C, D E, F, G y H y dentro de estos se reconocen 23 genotipos, los cuales son designados como A, B1, B2, B3, C1, C2, D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9, D10, E, F, G1, G2, G3, H1 y H2. Los genotipos E, F, G1 y D1, se extinguieron o inactivaron al no ser aislados por al menos 15 años (Ratnam y cols., 2000; Rota y Bellini, 2003; Rota y col, 2009).

En el genotipo A están agrupadas las cepas vacunales, las cuales incluyen aquellas derivadas de la cepa Edmonston original, así como las vacunadas derivadas de aislamientos efectuados en los años 1950 y 1960. Los genotipos B2 y B3, se identifican en África Central y parte de la occidental, sin embargo, los genotipos D2 y D4 se encuentran al sur y este de África. El C2 se aisló en el continente africano, sólo en su porción norte, específicamente en Marruecos, además en Europa Central, lo que sugiere que el patrón observado en la parte norte de África está más estrechamente relacionado con el patrón europeo, que con el africano (Rota y Bellini, 2003; Anónimo^b, 2006).

El D3 se aisló en Estados Unidos y el D6 en Europa, que fue el responsable de los grandes brotes producidos en Brasil, Argentina, Chile, Bolivia, Haití y República Dominicana en 1997. El D9 se asocia con casos de sarampión en la isla Indonesa de Java. En análisis de secuencia realizados, se encuentra ampliamente distribuido en China el genotipo H1 y en Vietnam el H2. Recientemente se aisló el genotipo G2, G3 y D9 en Indonesia y Malasia (Rota y Bellini, 2003; Anónimo^b, 2006).

II.1.10. Prevención y control.

Las vacunas inactivadas fueron las primeras en utilizarse, pero producían una rápida pérdida de los anticuerpos, posteriormente el amplio uso de la vacuna viva atenuada cambió los patrones de la enfermedad, reduciendo la incidencia de la misma, aumentando la edad de infección y el intervalo entre epidemias. Esta vacuna puede ser monovalente o combinada con la rubeola y la parotiditis, sin reducción de la capacidad inmunogénica de alguno de los tres componentes (Griffin, 2007).

La edad de vacunación recomendada varía de 6 a 15 meses. En lugares donde hay una alta prevalencia de sarampión, se realiza a los 9 meses y en aquellos donde esta prevalencia es baja, a los 12 ó 15 meses de edad (Tangy y Naim, 2005).

El alto grado de transmisibilidad de este virus, requiere el mantenimiento de una cobertura de vacunación de más de 95%, lo que significa una disminución en la aparición del sarampión y sus complicaciones (Metintass y cols, 2002; Marin y cols, 2006).

La inmunidad pasiva a través del uso de gammaglobulina hiperinmune, se puede emplear siempre y cuando se administre precozmente, en los seis primeros días de la exposición a la fuente de contagio (Griffin, 2007).

II.2. Rubeola

II.2.1. Concepto.

La rubeola es una enfermedad eruptiva que no es severa y que se caracteriza por la producción de fiebre moderada, erupción morbiliforme y linfadenopatías (Hobman y Chantler, 2007).

II.2.2. Historia.

La infección con el virus de la rubeola se consideró en sus inicios como una variante del sarampión y se le llamó “tercera enfermedad”. En 1800, el médico alemán Bergen la llamó Rtheln, que quiere decir, “sarampión alemán”. En 1914, en estudios realizados en monos, se postula su etiología viral, confirmándose la misma en 1938 por Hiro y Tosaka al reproducir la enfermedad en niños, empleando para ello, lavados nasales filtrados procedentes de casos agudos (Wolinsky, 1996).

Después de una epidemia producida en 1940, el Dr. Norman Gregg, oftalmólogo australiano, reportó en 1941 una epidemia aparente de cataratas congénita. Gregg encontró un gran número de niños con esta patología, muchos de los cuales tenían una serie de defectos congénitos adicionales y un gran número de estos casos fueron precedidos por un brote de rubeola, sugiriendo que la infección natural era la causa de estas malformaciones (Gregg, 1996).

A medida que se fueron realizando estudios, se pudo demostrar que la infección en el período inicial de la gestación producía malformaciones en el feto, introduciéndose en la literatura médica el concepto de virus teratogénicos (Atreya y cols, 2004).

II.2.3. Agente infeccioso.

II.2.3.1. Clasificación.

El virus de la rubeola es el único miembro del género *Rubivirus* en la familia *Togaviridae*, la cual está constituida por pequeñas partículas virales envueltas por una capa lipídica, de ahí su nombre “Toga”. A pesar de que este virus comparte características de organización genética y estrategias de multiplicación con los alfavirus, no hay reactividad cruzada entre ellos y sólo existe homología genética en limitadas regiones entre sus proteínas no estructurales (Best, 2007).

El virión es una partícula esférica de 60 a 70 nm de diámetro. Cada uno de ellos posee una envoltura lipídica derivada de la célula huésped, en la cual se encuentran dos glicoproteínas (E1 y E2) con 5 a 8 nm de diámetro y que protruyen en la superficie de la envoltura viral. La mayor de las

proteínas de la envoltura es la E1, que tiene un peso molecular de 58 000 a 62 000 y se presenta en el virión maduro en forma monomérica asociada a la proteína E2. La molécula madura de la proteína E1, define dominios que están relacionados con la unión a la superficie de los glóbulos rojos y en la iniciación de la infección; la función de E2 aún se desconoce. El núcleo tiene una simetría icosaédrica que contiene 32 capsómeros, con un genoma ARN de simple cadena de polaridad positiva que posee cerca de 10 kilobases (kb) en longitud y se une a la proteína de la cápside (Proteína C) por enlaces disulfúricos. El extremo 5' terminal del ARN, posee un contenido de guanina + citosina del 69%, la mayor encontrada en virus ARN hasta nuestros días (Schlesinger y Schlesinger, 2001).

Estudios realizados en 1984, identificaron dos especies de ARN que inducen la producción de virus en las células infectadas, con una longitud desde 38S a 40S y la otra desde 24S a 26S. La más larga representa la longitud completa del genoma e induce a la infección cuando se transfiere a la célula huésped, la más corta actúa como Ácido Ribonucleico mensajero (ARNm) subgenómico que participa en la formación de proteínas estructurales del virión (Schlesinger y Schlesinger, 2001).

II.2.3.2. Resistencia y sensibilidad a los agentes físicos y químicos.

Es un virus lábil al calor y se inactiva rápidamente a 56 °C. Es estable por largos periodos de tiempo a temperaturas de menos de 60 °C ó inferiores a ésta, sensible a los cambios de pH y si se liofiliza, puede ser almacenado a 4 °C por varios años y a temperatura ambiente (TA) durante varios meses. Se inactiva en presencia de solventes orgánicos como el éter, cloroformo, desoxicolato de sodio y agentes que desnaturalizan las proteínas como el formaldehído y la β propiolactona, así como en presencia de la luz ultravioleta (Wolinsky, 1996).

II.2.3.3. Rango hospedero.

El virus de la rubeola tiene sólo como hospedero natural al humano, pero se replica en una gran variedad de células de mamíferos donde se incluyen las BHK/21 (Riñón de hamster recién nacido, siglas del inglés, Baby hamster kidney cells), RK13 (Riñón de conejo, siglas del inglés, Rabbit kidney cells) y VERO, en las que se observa más fuertemente el ECP del virus (Haukenes, 2002).

No hay modelo animal para el estudio del virus, sin embargo, existen animales de laboratorio como los monos Rhesus y los verdes africanos, que desarrollan viremia y en los que se puede encontrar el virus en las secreciones respiratorias, además producen respuesta inmune humoral semejante al

humano. Ningún sistema animal produce suficientes evidencias que permita el estudio de la patogenia de la enfermedad o del SRC (Haukenes, 2002).

II.2.4. Patogenia y patología.

La enfermedad se transmite por aerosoles de las personas infectadas a individuos susceptibles. El virus se multiplica a nivel de la mucosa del aparato respiratorio superior y luego se disemina por vía linfática a los ganglios regionales. Después de un período de incubación de 7 a 10 días, se produce la fase virémica, la cual está marcada por los pródromos de la enfermedad y cesa al aparecer la erupción, comenzando el período de detección de los anticuerpos circulantes. Posteriormente, el virus se detecta en la nasofaringe, donde puede permanecer varias semanas. Esta patología cursa de forma asintomática en el 25% de los casos (Haukenes, 2002).

En el SRC, se produce una infección de las células de la placenta y el feto y aunque un número limitado de las mismas son infectadas, la tasa de crecimiento se reduce, trayendo como resultado que el número de células en los órganos infectados sea inferior al que le corresponde normalmente, produciéndose una hipoplasia de los órganos y alterándose su desarrollo, dando lugar a anomalías estructurales en el recién nacido (Córdoba y cols, 1997; Lee y Bawden, 2000).

El estadio del embarazo en el cual se produce la infección viral determina la extensión del efecto teratogénico, por lo tanto, mientras más temprano sea, mayor será el daño causado. En la mujer embarazada se puede producir una infección inaparente que también causa daños al feto y muy pocos escapan a la infección durante el primer mes de gestación (Lee y Bawden, 2000).

II.2.5. Respuesta inmune

La respuesta de anticuerpos de tipo IgM específica al virus de la rubeola, se observa al inicio de la enfermedad y nos indica que la infección está en fase aguda, pero pueden persistir alrededor de 4 a 12 semanas, extendiéndose en algunos de los casos hasta un año (Figura 2) (Wilson y cols, 2006).

La respuesta de tipo IgG, es fundamentalmente de tipo IgG1, ya que la IgG3 e IgG4 son raramente reportadas. Esta respuesta nos habla de la existencia de una infección previa por el virus de la rubeola y se detectan de 7 a 10 días del inicio de la erupción, perdurando para toda la vida (Edlich y cols, 2005).

Los anticuerpos de tipo IgA, específicamente IgA1, se detectan en suero y exudado nasofaríngeo hasta 5 años después de iniciada la infección. Los de tipo IgE e IgD se observan inmediatamente después de iniciada la misma y persisten aproximadamente 6 meses (Wilson y cols, 2006).

En el SRC, la respuesta inmune difiere de la observada en la infección por rubeola en mujeres no embarazadas. Los niños con SRC al nacer tienen, además de los anticuerpos de tipo IgG adquiridos por vía transplacentaria, anticuerpos de tipo IgM, sintetizados por el feto como respuesta a la infección con el virus. En los niños mayores de un año es muy difícil confirmar al virus de la rubeola como el agente etiológico específico de las malformaciones congénitas que presentaron al nacer (Edlich y cols, 2005).

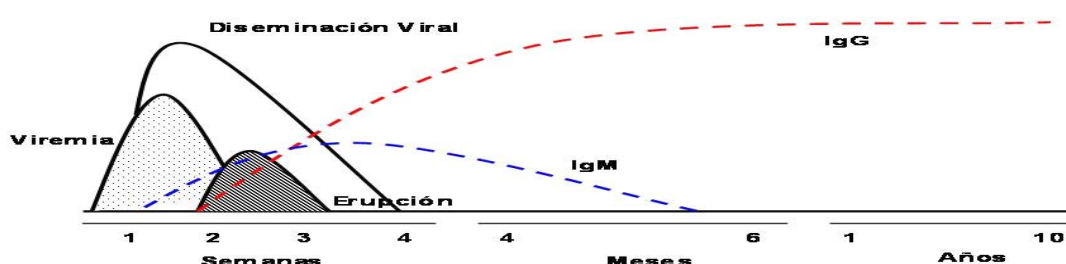


Figura 2. Respuesta inmune a la infección por el virus de la rubeola. Tomado de Clínica Virology, 1997.

II.2.6. Manifestaciones clínicas.

II.2.6.1. Rubeola post natal.

Se produce fundamentalmente en niños y adultos jóvenes, no es una patología severa y en muchos casos se manifiesta de forma subclínica. Las secreciones nasofaríngeas son la fuente principal de infección, pero los contactos casuales pueden no llevar a que ésta se produzca (Lee y Bawden, 2000).

La enfermedad se caracteriza por una combinación de síntomas entre los que se destacan la erupción maculopapular, linfadenopatías cervicales y suboccipitales, las cuales son dolorosas en los adultos, no así en los niños, además de fiebre no muy elevada, conjuntivitis, dolor de garganta y artralgia. El período de incubación es de 14 a 21 días, después del cual la erupción puede aparecer, siendo el signo más prominente de la enfermedad y se encuentra en el 95% de los casos, se inicia en la cara, se extiende al tronco y las extremidades y raramente dura más de tres días (Edlich y cols, 2005).

II.2.6.2. Síndrome de Rubeola Congénita.

Se produce en mujeres infectadas por el virus durante el primer trimestre del embarazo, lo que da lugar a una infección fetal la cual puede ser persistente o generalizada provocando una enfermedad multisistémica. Algunos de los defectos producidos pueden ser reconocidos en el momento del nacimiento y otros sólo se detectan meses o años más tarde. Las manifestaciones del síndrome pueden ser transitorias, permanentes o emerger posteriormente y también pueden ser generales, del sistema auditivo, cardiovascular, ocular, manifestaciones transitorias en el neonato, entre otras (Sanz y de Ory, 2006; Weir y Sider, 2006).

II.2.7. Complicaciones.

Las complicaciones no son frecuentes, pero en algunos casos podemos encontrar poliartralgia, artralgiyas y artritis, especialmente cuando la infección ocurre en adolescentes y mujeres adultas. También las artropatías, trombocitopenia y encefalopatías surgen en un período más tardío de la enfermedad. La complicación más seria encontrada es la encefalitis post infecciosa, la cual ocurre en 1 de cada 6 000 casos y aparece del primero al sexto días de iniciada la erupción (Bale, 2002).

1.- Artritis y artralgiyas: Se producen más frecuentemente siguiendo a la infección natural por el virus de la rubeola. La artritis poliarticular ocurre entre el 33 % y el 52% de las mujeres y solo en el 9% - 10% de los hombres. La patogenia de esta artritis no es bien conocida, algunos estudios plantean, que se debe a la presencia de inmunocomplejos circulantes (Wolinsky, 1996; Mitchell y cols, 1998).

2.- Complicación Neurológica: Las encefalitis y encefalopatías post infecciosas, son muy raras. El porcentaje de ocurrencia de las mismas es de 1 en 6 000 casos y cuando ocurren, los síntomas neurológicos parecen entre 1 a 6 días después de iniciada la erupción. La mortalidad es de un 20% - 50% y la patogénesis de esta complicación aún no es clara (Bale, 2002).

II.2.8. Diagnóstico de laboratorio.

El diagnóstico clínico es difícil de realizar, ya que se debe hacer diagnóstico diferencial con otras patologías productoras de erupción, tales como sarampión, parvovirus B19, herpes virus 6, enterovirus, adenovirus, dengue, alergia a medicamentos, etc, por lo que el diagnóstico de laboratorio es fundamental.

II.2.8.1. Aislamiento e identificación viral.

El virus puede ser aislado de las secreciones nasofaríngeas, sangre y orina, así como por tejido de necropsia cuando es necesario. Las muestras deben ser almacenadas a 4 °C y luego trasladadas al laboratorio en frío (Sanz y de Ory, 2006).

El ECP que se produce es variable, observándose en un período de 24 horas un redondeamiento y desprendimiento de la monocapa celular, aumentando de 48 a 72 horas. Se emplean para el aislamiento las células VERO y BHK21 por permitir una replicación más rápida y un aumento en el título del antígeno, siendo la identificación del aislamiento por las técnicas de NT, IFI o RCP (Cutts y cols, 1999; Haukenes, 2002).

II.2.8.2. Diagnóstico serológico.

Se utilizan tanto para el diagnóstico postnatal, como en el caso de infecciones congénitas o para determinar el estado inmune de una población. Muchas técnicas se encuentran disponibles para la detección de anticuerpos IgM, IgG y la avidez de la IgG entre las que tenemos, la hemólisis radial, el ELISA, aglutinación por látex, la IH y la Nt (Cutts y cols, 1999; Mubareka y cols, 2007).

II.2.8.3. Diagnóstico molecular.

Se realiza la hibridación de ácidos nucleicos y la RCP, para lo cual se emplean muestras de exudados nasofaríngeos y orina. La RCP es una técnica más rápida y sensible, pero generalmente se utiliza en los estudios de epidemiología molecular (Cooray y cols, 2006).

II.2.8.4. Diagnóstico de laboratorio del SRC.

En el período postnatal, se debe realizar la detección de la IgM específica al virus de la rubeola en sangre del cordón y en muestras de suero de los niños, demostrar la persistencia de anticuerpos de tipo IgG en niños de 8 meses de edad cuando los anticuerpos maternos ya desaparecieron, hacer el aislamiento del virus o la detección de ARN viral por la técnica de RCP durante los primeros meses de la vida (Anónimo ^a, 2005).

La hibridación de ácidos nucleicos y la RCP se emplean para detectar el ARN del virus en productos de la concepción, biopsias y líquido amniótico. En ausencia de confirmación por el laboratorio, un diagnóstico clínico compatible con SRC, requiere de la presencia de dos de los siguientes síntomas, cataratas, glaucoma congénito, enfermedades cardíacas congénitas, pérdida de la audición o retinopatías pigmentarias. Uno de los signos anteriores, más otras manifestaciones

adicionales como son púrpura, microcefalia, retardo mental y meningoencefalitis, ayudan a realizar el diagnóstico de la enfermedad (Anónimo^c, 2008).

II.2.9. Epidemiología.

La rubeola tiene una distribución mundial, hace picos estacionales durante la primavera y el inicio del verano y el uso de la vacuna en aquellos países con programas efectivos, extendieron los picos epidemiológicos de 3 a 10 años. Afecta a los niños de 5 a 9 años y adultos jóvenes, sólo existe un serotipo y su único hospedero es el humano (Haukenes, 2002).

Los estudios seroepidemiológicos demostraron, que la proporción de seropositivos aumenta con la edad y que de un 80% a un 85% de las mujeres en edad fértil son inmunes. La muerte atribuida a esta patología no es común (Wolinsky, 1996).

II.2.9.1. Epidemiología molecular.

Muchos de los estudios genéticos sobre el virus de la rubeola, se realizaron secuenciando total o parcialmente la región codificada de la proteína E1. Diferentes regiones de esta proteína se emplean actualmente en la caracterización genética del virus, pero la más empleada para el análisis molecular de rutina corresponde a la de 739 nucleótidos (8731 – 9469) (Zheng y cols, 2003, Anónimo^b, 2006).

Los grupos filogenéticos más importantes del virus de la rubeola, difieren en un 8 a un 10% en su secuencia nucleotídica y se les denominan variante 1 y 2. Existen además 7 sub variantes que se denominan 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 2A y 2B y se describen 3 genotipos provisionales (1a, 1g, 2c). El genotipo 1a incluye virus aislados en 1960 (primeras cepas vacunales), pero la presencia del mismo es muy poco frecuente en los últimos años. Recientemente se encontraron en Mongolia y Myanmar (Anónimo^b, 2006).

El 1g se considera provisional porque la secuencia de referencia no está disponible, mientras que 1B, 1C, 1D y 1F circulan en ciertas áreas geográficas, específicamente el 1B, el cual se encuentra en Europa y a lo largo de la costa este de América del Sur. El 1C circula en América Central y a lo largo de la costa oeste de Sur América; el 1D se halló en los países asiáticos y en Etiopía y el 1F en China. El genotipo 1C sólo se observó una vez en Japón y se piensa que fue importado de un brote ocurrido en América, aunque no hay datos epidemiológicos directos que lo confirmen. El 1D se observó inicialmente en Canadá y Estados Unidos y el 1E se identificó en 1997 y ahora tiene una distribución mundial (Zheng y cols, 2003; Anónimo^b, 2006; Anónimo^c, 2008).

Los virus que forman parte de la variante 2 se encuentran en África, Asia y Europa. El 2A se aisló en China en 1979 y 1980 y no aparece desde entonces, el 2B se distribuyó más ampliamente que otros genotipos y el 2C sólo se observó en la Federación Rusa (Anónimo^c, 2008).

II. 2.10. Prevención y control.

Como la rubeola post natal es una enfermedad benigna, la vacunación tiene por objeto prevenir la rubeola congénita, por lo que el programa de vacunación va dirigido a todos los niños de 1 año y a las mujeres en edad fértil. Diferentes vacunas atenuadas se comercializan solas o en combinación con la de sarampión y parotiditis. La misma es bien tolerada y provoca pocas reacciones adversas (Best y cols, 2005).

La vacuna induce una inmunidad de un 95%, desarrollándose los anticuerpos entre los días 10 y 28 de aplicada la misma y persisten por lo menos 20 años después de la vacunación Para eliminar esta enfermedad y el SRC, se hace necesario inmunizar a las mujeres en edad fértil y mantener una alta cobertura vacunal de más de un 95% (Anónimo^b, 2006).

II.3. Parotiditis

II.3.1. Concepto.

Conocida como paperas u “orejones”, es una enfermedad viral que ocasiona la inflamación dolorosa, no supurativa de una o ambas glándulas salivales, por lo regular de las parótidas y a veces de las sublinguales o las submaxilares (Bagg, 1996).

II.3.2. Historia.

Fue descrita en el siglo V antes de Cristo (AC) por Hipócrates y recibe el nombre de parotiditis, Mumps, ya que se deriva de un viejo verbo inglés que significa gesto, mueca. A finales del siglo XVIII, el doctor Hamilton es reconocido como el primer investigador en asociar la enfermedad con la invasión al Sistema Nervioso Central (SNC), como resultado de una neuropatología de un caso fatal (Plotkin y Wharton, 1999).

En 1934, Johnson y Goodpasture precisaron la etiología vírica de la enfermedad y posteriormente Rocchi en 1943 y Habel en 1945, cultivaron el virus en diferentes medios (Bernaola y cols, 2005).

II.3.3. Agente infeccioso.

II.3.3.1. Clasificación.

Pertenece a la familia *Paramixoviridae*, sub familia *Paramixovirinae*, género *Rubulavirus*. Los viriones pleomórficos son principalmente esféricos, de aproximadamente 100 a 600 nm de diámetro, con una membrana externa que envuelve una nucleocápside helicoidal de 18 nm. La envoltura posee proyecciones formadas por glicoproteínas virales que alcanzan de 12 a 15 nm desde la superficie exterior y la estructura interna de la nucleocápside, es un complejo de ribonucleoproteínas que aparenta un tubo hueco con un diámetro de 17 nm y un núcleo central de 5 nm. El ARN genómico es no segmentado, lineal, de cadena única negativa y contiene 15,3kb (Andzhaparidze y cols, 1981; Lamb y Kolakosfsky, 2001).

El orden de los genes está constituido por 3'-PN-P-M-F-SH-NH-L-5'. Existe una secuencia líder de 55 nucleótidos (no transcrita) y una secuencia final de 24 nucleótidos que comparten complementariedad inversa en sus extremos (Okazaki y cols, 1992). Los transcriptos mono, di y policistrónicos de estos genes son variables en las diferentes células infectadas por el virus (Afzal y cols, 1997).

El virus de la parotiditis contiene 6 proteínas estructurales, la N contiene 549 amino ácidos (aa) y tiene un peso molecular de 61,3 kDa, interviene en la encapsidación del ARN genómico y se asocia con la P y la L durante la transcripción y la replicación (Tanabayashi y cols, 1990). La P se encuentra altamente fosforilada, su peso molecular es de 41,6 kDa y se identifica por su localización interna en el virión, la talla y su asociación con la nucleocápside. Forma un complejo con el ARN viral (N y L), que participa en la transcripción y replicación del ARN (Elliott y cols, 1990; Yamada y cols, 1990).

La proteína L se encuentra asociada con la nucleocápside viral como parte del complejo de la transcriptasa, tiene un peso molecular de 256,6 kDa y constituye la polimerasa viral: ARN polimerasa ARN dependiente (Okazaki y cols, 1992).

La proteína M es la más abundante en el virión, está compuesta por 375 aa y tiene un peso estimado de 41,6 kDa. Se encuentra asociada a la membrana, es no glicosilada y juega un importante papel en el ensamblaje de los viriones. Su estructura primaria está conservada entre las distintas cepas del virus y exhibe una considerable homología con otros virus (Elliott y cols, 1990).

Las glicoproteínas de la envoltura están unidas a la membrana y se encuentran acetiladas. La expresión de ambas es requerida para una fusión célula-célula eficiente (Lim y cols, 2003).

La hemaglutinina – neuramidinasa (HN), es la glicoproteína más larga, está compuesta de 582 aa y tiene un peso molecular de 64 kDa cuando no está glicosilada. Esta proteína unida a la F, media la adsorción del virus a la célula y es la más conservada entre las diferentes cepas del virus (Lim y cols, 2003; Kulkarni-Kale y cols, 2007).

El gen F codifica para una proteína de 538 aa con un peso molecular aproximado de 58,8 kDa. Las formas activas de la proteína (F1 y F2) son producidas por el clivaje de la proteína inmadura F0 y una proteasa de la célula hospedera, la cual reconoce una secuencia de 5 aa básicos (Arginina, Arginina, Histidina, Lisina, Arginina) del extremo carboxilo terminal de la proteína F0. El dominio hidrofóbico de F1 es la región más importante funcionalmente para la unión, iniciando este proceso intercalándose con la bicapa lipídica de la membrana citoplasmática de la célula blanco a pH neutro. Además, la proteína F es requerida para la penetración de la nucleocápside viral dentro de la célula hospedera y en la hemólisis (Elliott y cols, 1990).

II.3.3.2. Rango hospedero.

El único reservorio del virus de la parotiditis es el hombre, pero también se reportó que la infección se produjo en varias especies animales como son los monos, hamsters adultos y lactantes, ratones lactantes y embriones de pollos (Kilham y Murphy, 1952; Levenbuk y cols, 1979).

II.3.4. Patogenia y patología.

La infección natural se produce a través de aerosoles de secreciones respiratorias de una persona infectada a una susceptible, iniciándose la replicación del virus a nivel del epitelio de la mucosa del aparato respiratorio superior (Johnson y Goodpasture, 1935).

Posteriormente, pasa hacia los ganglios linfáticos regionales con la subsiguiente diseminación a la sangre, produciéndose una viremia primaria y la aparición de la inflamación de las glándulas salivales. Seguida a esta fase, se inicia una viremia secundaria donde ocurre la infección a otros órganos y tejidos del cuerpo.

El primer síntoma clínico está relacionado con la infección de las glándulas parótidas, observándose edema del conducto de la glándula y reacción inflamatoria local con aumento de linfocitos y macrófagos. La inflamación y el daño tisular, puede producir el aumento de anticuerpos en el suero y los niveles de amilasa en la orina (Olivier, 2002).

II.3.5. Respuesta inmune.

La inmunidad es permanente después de una infección, ya que existe solamente un tipo antigénico del virus y no hay variación significativa. La madre transfiere sus anticuerpos al niño por vía transplacentaria, por lo que no es frecuente observar esta enfermedad en lactantes menores de 6 meses (Gnann, 2002).

Se encontraron linfocitos CD8+ en sangre y en LCR tras la infección natural y la vacunación. El hallazgo de células inflamatorias al inicio del cuadro clínico en el tejido infectado sugiere, que la inmunidad celular específica se desarrolla durante el período de incubación (Carbone y Wolinsky, 2001). La infección por el virus de la parotiditis incluye la formación de anticuerpos del tipo IgM, IgA e IgG. Los anticuerpos de tipo IgM específicos aparecen en etapas tempranas de la infección, de 3 a 5 días de iniciados los síntomas clínicos, alcanzando su pico máximo entre las 2 primeras semanas y decaen en los siguientes 2 a 6 meses (Gnann, 2002).

II.3.6. Manifestaciones clínicas.

La parotiditis se caracteriza por fiebre, acompañada de inflamación dolorosa de una o ambas glándulas parótidas. A los 3-4 días de iniciados los síntomas, el dolor se vuelve intenso, sobre todo, cuando se ingieren sustancias ácidas. También se pueden ver afectadas las glándulas submaxilares y sublinguales (Bedford, 2005).

La inflamación de las glándulas continúa durante 1 a 3 días y una vez que alcanzan su tamaño máximo, disminuyen gradualmente entre 3 a 7 días. La duración del cuadro clínico de la enfermedad sin complicaciones, suele durar alrededor de una semana (Zhamerichev, 1993; Cunningham y cols, 2006).

Estas manifestaciones típicas de la enfermedad no siempre están presentes, ya que entre un 20 - 40% de las infecciones no producen síntomas y hasta un 40 - 50% están asociadas sólo con manifestaciones no específicas, principalmente respiratorias, de manera que de un 30-40% producen un cuadro de parotiditis aguda típica (Bedford, 2005; Suárez, 2005).

II.3.7. Complicaciones.

Las complicaciones en el curso de la enfermedad no son frecuentes, pero una amplia variedad de otros órganos pueden involucrarse en el curso de la parotiditis, como son: el SNC, epidídimo, próstata, hígado, páncreas, bazo, tiroides, corazón, glándulas mamarias, riñones entre otras (Kim y Cappelen-Smith, 2005; Kodz y cols, 2006; Sauder y cols, 2006).

II.3.8. Diagnóstico de laboratorio.

En la mayoría de los casos el diagnóstico es clínico. El antecedente de exposición a un sujeto enfermo más la inflamación y el dolor de las glándulas parótidas en un cuadro de malestar general leve o moderado, suele ser suficiente para establecer el diagnóstico (Suárez, 2005).

El diagnóstico diferencial se realiza con otras enfermedades que producen aumento de volumen de las glándulas por otras causas tales como, la sensibilidad al yodo, sarcoidosis, tumores, infecciones supurativas, síndrome de Sjögren's y de otros virus tales como Parainfluenza tipo 1 y 3, Influenza A, Coxsackie, entre otras (Carbone y Wolinsky, 2001).

II.3.8.1. Aislamiento e identificación viral.

Se pueden utilizar muestras de orina, suero, saliva y LCR. Las muestras de saliva permiten el aislamiento del virus cuando son colectadas en un período de 4 a 5 días del inicio de los síntomas (Perry y cols, 1993). En el caso de la orina, la toma de la muestra debe realizarse 2 semanas después del comienzo del cuadro clínico y las de LCR entre 8 y 9 días de iniciada la meningitis. La muestra de suero debe tomarse en etapas tempranas de la infección, de 3 a 5 días de iniciados los síntomas clínicos (Sakata y cols, 1985).

Para el aislamiento se utilizan cultivos primarios y líneas celulares (VERO y HeLa). El ECP observado es la formación de sincitios, seguido de la destrucción de la monocapa de células infectadas, ésta varía entre los aislamientos y el sistema celular empleado. También se pueden observar con menor frecuencia otros ECP, tales como, vacuolización, formación de inclusiones citoplasmáticas, pycnosis y lisis celular con cambios morfológicos. No todas las cepas del virus producen ECP, su replicación puede ser verificada por hemadsorción a los 3-6 días de la inoculación (Germann y cols, 1998).

La identificación del aislamiento puede realizarse mediante diferentes técnicas, entre ellas, la inhibición de la hemadsorción, neutralización por reducción del número de placas, IFI y RCP (Mauldin y cols, 2005).

II.3.8.2. Diagnóstico serológico.

Los ensayos serológicos empleados son, la IH, los ELISA, que permiten la detección de anticuerpos de tipo IgM e IgG, la IFI, radioinmunoensayos, hemólisis en gel, fijación del complemento e inmunodifusión radial (Grillner y Blomberg, 1976; Hopps y Parkman, 1979; Backhouse y cols, 2006; Krause y cols, 2007).

II.3.9. Epidemiología.

La parotiditis es una enfermedad de distribución mundial que afecta al humano, fundamentalmente a los niños entre 5 y 14 años de edad; el 50% de los casos ocurre entre los 5-9 años y el 90% en menores de 16 años. Presenta un período de incubación de 12 a 25 días y el modo de transmisión es a través de aerosoles y por contacto directo con la saliva de una persona infectada a otra. Se presenta con mayor frecuencia en los meses de invierno y primavera. El período de infecciosidad máxima ocurre unas 48 horas antes del comienzo de la enfermedad (Herzog, 1995; Benenson, 1997).

II.3.9.1. Epidemiología molecular.

La epidemiología molecular del virus de la parotiditis está caracterizada por la co-existencia de 10 ó más genotipos, los cuales están nombrados desde la letra A a la K, basados en la secuencia nucleotídica del gen SH, encontrándose variaciones de un 8 a un 18% entre los mismos, sin embargo, estudios realizados en virus procedentes de diversas regiones geográficas y de distintas épocas, demostraron secuencias idénticas de este gen o con muy alta homología (Orvell y cols, 2002).

Las cepas empleadas en la vacuna derivaron de aislamientos obtenidos en varios países entre los años 60 y 70 y pertenecen a diferentes genotipos, por ejemplo, la Jeryl – Lynn y la Rubini se agrupan en el genotipo A, mientras que Leningrad 3 y la cepa derivada de ella, la L- Zagreb, pertenecen al D y la Urabe AM9 al B (Jin y cols, 2005).

Los genotipos se distribuyen en diferentes regiones geográficas. En el hemisferio occidental se han encontrado el C - E, G y H, mientras que el B, F e I, se aíslan en los países de Asia, también puede ocurrir la circulación simultánea de diferentes genotipos en un mismo país o región (Muhlemann, 2004).

II.3.10. Prevención y control.

Las medidas de control de la enfermedad están dirigidas a la prevención y principalmente encaminadas a controlar la alta incidencia de las infecciones asintomáticas, el largo período de excreción viral desde el inicio de los síntomas clínicos y la presencia de casos sin parotiditis. La administración de la gammaglobulina hiperinmune pudiera reducir la incidencia en la población si se administra al inicio de un brote, pero la prevención a través del empleo de programas de vacunación es la única vía racional para el control de esta enfermedad (Carbone y Wolinsky, 2001; Gnann, 2002).

Hay 2 tipos de vacunas contra la parotiditis, las de virus muerto en la cual la respuesta de anticuerpos de la clase IgG parece ser limitada y no existe respuesta de IgM y la de virus vivos

atenuados, cuya utilización produce una disminución marcada en la incidencia y la ocurrencia de secuelas por la infección natural (Wright y cols, 2000; Ihara, 2005; Saika y cols, 2006).

II. 4. Vigilancia de PRS.

II. 4.1. Definiciones.

II.4.1.1. Definición de Sistema de Vigilancia Epidemiológica (SVE).

Es la recolección sistemática, continua, oportuna y confiable de la información relevante y necesaria, sobre algunas condiciones de salud de la población, donde el análisis e interpretación de los datos, debe proporcionar las bases para la toma de decisiones y al mismo tiempo, ser utilizada para su difusión. Para que este sistema de vigilancia sea efectivo debe ser simple, flexible, aceptable, sensible, representativo y oportuno (Concha y Villaveces, 2001; Roush y Wharton, 2008).

II.4.1. 2. Definición de vigilancia de laboratorio.

Es el tipo de vigilancia permite confirmar el diagnóstico y obtener evidencia de factores de riesgo de una enfermedad de interés para la comunidad (Concha y Villaveces, 2001; Roush y cols; 2008; Roush y Wharton, 2008).

II.4.1.3. Definición de caso de sarampión, rubeola y parotiditis.

Estas definiciones se emplean de manera uniforme en la vigilancia a nivel global (OPS^a, 1999; WHO^b, 1999; CDC, 2008)

1.- Caso sospechoso: Todo paciente con erupción maculopapular con fiebre, es sospechoso de presentar sarampión o rubeola y de parotiditis, aquel que presente aumento de volumen de las glándulas parótidas y fiebre.

2.- Caso probable: Esta definición se aplica en el sarampión, cuando se está en presencia de una erupción maculopapular generalizada de 3 ó más días de duración acompañada de fiebre generalmente elevada y uno de los siguientes síntomas: tos, coriza o conjuntivitis.

En el caso de la rubeola, al aparecer una erupción maculopapular generalizada de comienzo agudo, con fiebre de moderada a intensa, adenopatías (post auriculares, occipitales y cervicales posteriores), conjuntivitis, pudiendo estar acompañada o no de artritis o artralgias.

Se considera un caso probable de parotiditis, aquel que presenta fiebre y aumento de volumen agudo uni o bilateral, sin supuración, de la glándula parótida, de más de dos días de evolución y sin otra causa aparente de esta manifestación.

3.- Caso confirmado: Es un caso probable de cualquiera de estas tres enfermedades, con confirmación de laboratorio o vínculo epidemiológico con otro caso confirmado.

4.- Caso compatible: Aquel caso probable, que falleció tras un cuadro clínico compatible o que no fue objeto de seguimiento.

5.- Caso importado: Persona que visitó otro país dentro de los 21 días precedentes al inicio de la enfermedad y no estuvo expuesto a ningún caso local.

6.- Caso descartado: Es un caso probable en el cual se confirma, a través de resultados de laboratorio, una infección diferente al sarampión, la rubeola o la parotiditis

II.4.1.4. Definición de eliminación y erradicación.

Eliminación, es la reducción a cero de la incidencia de una enfermedad causada por un agente infeccioso, en un periodo igual o mayor de 12 meses, en una determinada área geográfica, como resultado de un esfuerzo deliberadamente realizado y necesita de una vigilancia continua para evitar el restablecimiento de la transmisión del agente (Molyneux y cols, 2004; Castillo^a y Ruiz, 2009; Oresteín, 2010).

Erradicación, es la reducción a cero, de forma permanente y a nivel mundial, de la infección causada por una agente infeccioso, como resultado de un esfuerzo deliberadamente realizado y no necesita intervenciones futuras (Molyneux y cols, 2004; Castillo^a y Ruiz, 2009; Oresteín, 2010).

II.4.2. Funciones de la vigilancia de laboratorio.

El laboratorio desempeña un papel importante en la vigilancia de las enfermedades infecciosas, encontrándose dentro de sus funciones, la confirmación del diagnóstico clínico y epidemiológico, detección de brotes, confirmación de la transmisión y la fuente geográfica de los mismos, detección de nuevos patógenos, tipificación y caracterización de patógenos, establecimiento del principio o terminación de un brote o epidemia, así como de la eliminación o erradicación de una enfermedad. Además, en colaboración con epidemiología, participa en el establecimiento de la definición de caso y manejo de los mismos, intervenciones y evaluaciones, estrategias de inmunización y estudios de prevalencia (OMS^b, 2006).

II.4.3. Indicadores de la vigilancia de laboratorio de PRS.

Diferentes indicadores permiten monitorear y corregir deficiencias en la vigilancia, entre los que se encuentran (WHO^c, 2003):

- 1.- Determinación del porcentaje de casos estudiados adecuadamente, a las 48 horas de la notificación.
- 2.- Porcentaje de casos con muestra adecuada, tomada dentro de los tres primeros días de iniciada la erupción.
- 3.- Porcentaje de muestras de sangre que llegan al laboratorio, dentro de los primeros cinco días posteriores a la toma de la muestra.
- 4.- Porcentaje de casos con resultado de laboratorio, en los cuatro días posteriores a la recepción de la muestra.
- 5.- Porcentaje de brotes con muestras de orina o exudado nasofaríngeo, tomadas dentro de los primeros cinco días posteriores al inicio del cuadro.

II.4.4. Vigilancia integrada del sarampión, la rubeola y la parotiditis.

Al iniciarse las diferentes estrategias para eliminar el sarampión, la OMS planteó la oportunidad de eliminar al mismo tiempo la rubeola y el SRC, incorporando la vacunación combinada o la triple viral a los programas de inmunización y creando una vigilancia integrada de estas dos enfermedades. Sólo los países de Las Américas y Europa, pudieron dar inicio a esta estrategia, debido a que, por problemas de logística y disponibilidad de recursos, no fue posible aplicarla en las otras regiones del mundo (OMS^c, 2010). En cuanto a la vigilancia de la parotiditis, aún es muy variable a nivel global y es fundamentalmente pasiva. Entre 1999 y el 2004, el 57% de los estados miembros de la OMS, habían incorporado al programa nacional de Inmunizaciones (PNI) la vacunación contra este virus y mantenían el control de la enfermedad. El 66% de los países en vías de desarrollo usaron esta vacuna de forma rutinaria, pero ninguno de los considerados como más pobres, pudieron aplicar al menos, una dosis de la misma (WHO^d, 2010).

II.4.5. Vigilancia de sarampión y rubeola en diferentes regiones del mundo.

Región de Las Américas. En 1994, se estableció la meta de eliminar el sarampión para el año 2000, lográndose coberturas de vacunación de un 84%. En 2002, se reportó la interrupción de la transmisión del sarampión endémico y en 2003, se da inicio a la estrategia de eliminar la rubeola y

el SRC para el año 2010. Muchos factores contribuyeron a lograr este objetivo, dentro de ellos, la incorporación de la vacuna bivalente sarampión/rubeola o la triple viral a los programas de inmunización de los países, el cumplimiento de las estrategias de vacunación, la alta cobertura vacunal, el compromiso político, el suministro ininterrumpido de vacunas y estuches para el diagnóstico, entre otros (Castillo^a y Ruiz, 2009; OMS^e, 2010).

Región Africana. En 2006, se logró reducir un 90% de la mortalidad por sarampión, debido al esfuerzo de los estados y a la aplicación de estrategias que dieron buenos resultados en las Américas, no obstante, en 2008, un total de 7,7 millones de niños menores de un año no recibieron la primera dosis de la vacuna. El objetivo planteado en esta región, es eliminar el sarampión para el año 2020, esperándose un compromiso político sostenido y una mejoría en la cobertura de vacunación antisarampionosa sistemática (Duclos y cols, 2009; OMS^e, 2010).

Región del Mediterráneo Oriental. El objetivo de los estados miembros es eliminar el sarampión para el 2010. En 2007, se logró una reducción de un 90% de la mortalidad por esta enfermedad y en 2008 la cobertura de vacunación fue de un 85%. Se espera que sólo algunos países logren la eliminación entre 2010 y 2020, ya que se desconocen las fuentes de financiamiento para la vacunación de seguimiento en 2010 y en los años siguientes, no existe una vigilancia adecuada y los conflictos y la inseguridad socavan el desarrollo de sistemas de salud eficientes (Duclos y cols, 2009; OMS^e, 2010).

Región Europea. En 1998, se planteó eliminar el sarampión y la rubeola/SRC para el año 2010. En 2007, la incidencia de sarampión disminuyó grandemente, sin embargo en 2008 se produjo un resurgimiento de esta enfermedad en los países de Europa Occidental, en grupos de poblaciones sin vacunar, donde los programas presentaban dificultades debido a políticas contra la vacunación. Se espera que para 2010, 30 de los 53 estados miembros no logren la eliminación, siendo necesario aumentar el compromiso político y social, mantener alta cobertura de vacunación, restablecer la confianza de las personas en la misma y monitorear la vigilancia a través de los indicadores de desempeño (Anónimo^d, 2009; OMS^e, 2010).

Región del Asia Sur Oriental. Con excepción de la India, todos los países lograron reducir un 90%, la mortalidad por sarampión, sin embargo, la región no logrará el objetivo mundial de eliminación, hasta que la India no ejecute las estrategias recomendadas. Los desafíos fundamentales son, lograr altas coberturas de vacunación, sostener las actividades de erradicación de la poliomielitis y hacer

estudios de eficacia de la vacuna antisarampionosa en lugares densamente poblados con tasas de natalidad elevada (OMS^c, 2010).

Región del Pacífico Occidental. En 2003, los países de la región decidieron eliminar el sarampión. Diferentes estrategias se llevan a cabo fundamentalmente en China y Japón, donde ocurre el 97% de los casos, para lograr la eliminación entre 2010 y 2015, necesitando obtener una alta cobertura de vacunación, voluntad política, vigilancia de calidad y apoyo de laboratorios acreditados (Anónimo ^e, 2009; Duclos y cols, 2009; OMS^c, 2010).

II.4.6. Vigilancia epidemiológica de PRS en Cuba.

Diferentes estrategias se desarrollaron en Cuba para el control y posteriormente la eliminación del sarampión, la rubeola y la parotiditis. En el año 1988, las autoridades de salud trazaron la meta de eliminar estas enfermedades en el quinquenio 1988-1993. Se elaboró un programa que comenzó a ejecutarse en abril de 1988, cuyas bases fundamentales estaban sustentadas por las premisas básicas de mantener coberturas de vacunación iguales o superiores al 95% en niños de un año con vacuna triple viral, establecer un sistema de vigilancia epidemiológica y de laboratorio integrada de estas tres enfermedades e implementar medidas agresivas de control de foco (MINSAP^a, 1995).

II.4.6.1. Vigilancia epidemiológica del sarampión.

Decenas de miles de casos de sarampión se reportaban en Cuba antes del período vacunal. Con el objetivo de disminuir la incidencia de esta patología, las autoridades del Ministerio de salud Pública (MINSAP) aplicaron varias estrategias, la primera de las cuales, (1971-1979), estuvo dirigida a lograr altas coberturas, inmunizando con vacuna antisarampionosa a niños de 6 meses a 5 años por ser este grupo el que aportaba el 63% de la incidencia de la enfermedad, antes del período vacunal. La cobertura alcanzada al final del año 1979 no sobrepasó el 70% y el único impacto observado fue el espaciamiento de los ciclos epidémicos de 2 a 5 años, ya que el resultado esperado no se produjo debido a la interferencia de los anticuerpos maternos con los desarrollados por la vacuna y no se incluyeron a los escolares de 6 a 14 años, los cuales aportaban el 24,5% de la incidencia (MINSAP^b, 1999).

Se aplicó una segunda estrategia, (1980-1985), donde se incrementó la cobertura con vacuna antisarampionosa en un 75 %. Se comenzó a vacunar a los niños a los 9 meses de edad, para evitar

interferencia con los anticuerpos maternos y se amplió la vacunación hasta los 14 años. El aumento en la cobertura de vacunación en la población menor de 15 años, produjo un marcado impacto sobre la morbilidad por sarampión y la tendencia de la mortalidad fue marcadamente descendente (MINSAP^b, 1999).

Con la tercera estrategia, (1986-1987), se inició la campaña nacional de vacunación con la vacuna triple viral en toda la población infantil entre 1 y 14 años, independientemente de estar inmunizados o padecer la infección natural con anterioridad. Al final de la misma, se incorporó esta vacunación al PNI al año de edad (MINSAP^b, 1999).

La cuarta estrategia, (1988-1993), dio inicio al programa para la eliminación del sarampión y se creó un sistema de vigilancia seroepidemiológica con la participación activa del laboratorio para la confirmación de los casos. Con este programa se lograron coberturas iguales o superiores a un 95%, se creó el SVE y se implantaron medidas para el control de foco (MINSAP^b, 1999).

II.4.6.2. Vigilancia epidemiológica de la rubeola.

Para el control de la rubeola en Cuba se aplicaron diferentes estrategias, la primera, (1982-1986), estaba dirigida a la eliminación a largo plazo del SRC, por lo que se vacunaron con la antirubeola las niñas de 12 a 14 años en el curso escolar 1982-1983 y en los cursos subsiguientes a las de 12 años, de tal manera que al final del curso escolar 1985-1986, estaban vacunadas todas las adolescentes entre 12 y 17 años (MINSAP^c, 1999).

En la segunda estrategia, (Enero - Agosto de 1986), se trató de lograr la eliminación a mediano plazo del SRC, vacunándose a todas las mujeres en edad fértil de 18 a 30 años, lográndose una cobertura del 72,8% y la tercera, (1986-1987), estuvo encaminada a la eliminación a corto plazo de la rubeola como enfermedad y el SRC, vacunándose con la triple viral a toda la población cubana desde 1 a 14 años, independientemente de estar vacunados anteriormente o padecer la infección natural (MINSAP^c, 1999).

II.4.6.3. Vigilancia epidemiológica de la parotiditis.

En Cuba, antes de 1959, la vigilancia de la parotiditis se hacía de forma pasiva, posteriormente se incluyó dentro de todas las enfermedades de notificación obligatoria, elevándose a miles los reportes anuales de morbilidad.

A partir de 1988, se establecieron y diseminaron a todos los niveles de salud los lineamientos para la vigilancia y se comenzó a investigar cuidadosamente la mayoría de los casos con sospecha de parotiditis, lo que incluía la extracción de muestras de sangre para la confirmación por el laboratorio, estableciéndose como estrategia para la eliminación de esta enfermedad, alcanzar y mantener una inmunidad elevada en la población y una esmerada vigilancia de casos sospechosos con la interrupción de la circulación del virus en el país (MINSAP^a, 1995).

Con la campaña de “puesta al día” en la vacunación antisarampionosa que se llevó a cabo en Cuba desde octubre de 1986 a marzo de 1987, empleando la vacuna combinada PRS, quedaron inmunizados contra la parotiditis todos los niños de 1 a 14 años de edad, independientemente de sus antecedentes de vacunación o de infección previa con la enfermedad (MINSAP^a, 1995).

En el quinquenio 1988-1995, las autoridades de salud se propusieron eliminar la parotiditis junto al sarampión y la rubeola, notificándose cada año, desde 1989, menos de 50 casos confirmados por pruebas serológicas. Durante el último trimestre del año 2004 fueron reportados en 3 provincias del país, más de 400 casos y durante los años 2005 y 2006 aumentaron las cifras de casos de parotiditis distribuidos en todo el territorio nacional. No obstante las medidas de control aplicadas en los brotes, la enfermedad continuó propagándose y el número de casos anuales fue superior a 1 000, la cifra más importante que hubo en Cuba desde que comenzó su vigilancia y control en 1988 (Valcarcel, 2007).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Producción de antígenos.

Tabla 1. Número de pases, título infectivo, procedencia y año de aislamiento de las cepas virales empleadas en la producción de antígeno de PRS.

Cepas Virales	Número de pases	Título infectivo	Procedencia	Año de aislamiento
Sarampión/Edmonston B	3P/VERO	$10^{-5.2}$ TCID ₅₀	ATCC/VR24/ Lot11/89-10	1989
Parotiditis/Urabe AM9	4P/VERO	10^{-6} TCID ₅₀	Instituto Pasteur (París, Francia).	1990
Rubeola / RA 27/3	4P/VERO	$10^{-6.5}$ TCID ₅₀	Instituto Carlos III (Majadahonda, Madrid, España).	1989

TCID: 50% de la dosis infectiva en cultivo de tejidos (siglas del inglés, Tissue Culture Infective Dose)

P: Pase

III.1.1. Producción del antígeno de la parotiditis y el sarampión para la realización de las técnicas de IH, IFI y el Sistema Ultramicroanalítico (SUMA).

Para la preparación del antígeno de sarampión y el de parotiditis, se empleó la línea celular VERO, obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC CRL 1688, Rockville, Maryland, EEUU) y cultivada en frascos plásticos Roller (Corning) en el departamento de Cultivos Celulares del IPK. Para la obtención del antígeno de sarampión, las células fueron inoculadas con 500 µl de la cepa Edmonston B y en el caso de la parotiditis se empleó igual cantidad de la cepa Urabe AM9. Después de una hora de contacto del virus con las células a 37°C, se añadió medio de crecimiento 199, suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 2% más antibióticos (penicilina y estreptomycin al 0,1%) y glutamina al 2%, para el mantenimiento de las mismas. A las 72 horas se les realizó un cambio de medio sin SFB.

Las células inoculadas se observaron al microscopio óptico diariamente, hasta que al quinto día, cuando el ECP fue aproximadamente del 100%, se procedió al desprendimiento de las mismas

empleando perlas de cristal. El sedimento se congeló y se descongeló en 10 ocasiones, luego se sonicó a razón de 6 ciclos durante 30 segundos cada vez, empleando un sonicador Soniprep-150 MSE y se centrifugó a 1 500 revoluciones por minuto (rpm), durante 15 min a 4⁰C. Posteriormente se recogió el sobrenadante, el cual se tituló empleando la técnica de hemaglutinación y se conservó posteriormente a menos 70⁰C hasta su uso (Gershong y Krugman, 1979; WHO^a, 1997).

III.1.2. Producción del antígeno de rubeola para la realización de las técnicas de IH, IFI y el SUMA.

En la preparación del antígeno de rubeola se empleó el método descrito por Vejtor en 1986. La cepa viral RA 27/3, fue inoculada en la línea celular VERO, la cual fue cultivada en frascos plásticos Roller (Corning) en el departamento de Cultivos Celulares del IPK. Se adicionaron 500 µl del inóculo a las células y se dejó en contacto durante una hora a 37⁰C, posteriormente se añadió medio de crecimiento 199 suplementado con SFB al 2% más antibióticos (penicilina y estreptomycin al 1%) y glutamina al 2%, para el mantenimiento de las mismas. A las 72 horas se cambió nuevamente el medio, pero esta vez sin suplementar con SFB.

Las células inoculadas fueron observadas diariamente hasta la aparición al quinto día del ECP de aproximadamente un 100% y se procedió al desprendimiento de las mismas de los frascos empleando perlas de cristal. Se centrifugó a 6 000 rpm durante 15 min a 4⁰C, luego se recogió el sedimento y el sobrenadante y se congelaron y se descongelaron en 3 ocasiones, centrifugándose en gradiente discontinuo de sacarosa (20% al 70%) a 40 000 rpm durante 2 horas a 4⁰C, posteriormente se procedió a la recogida de la banda formada, la cual se tituló por el método de hemaglutinación y se conservó a menos 70⁰C hasta su empleo (Gershong y Krugman, 1979; WHO^a, 1997).

III.2. Técnicas empleadas.

III.2.1. Técnica IH para la detección de anticuerpos a los virus del sarampión, la parotiditis y la rubeola.

Se emplearon las técnicas descritas por Gershong y Krugman en 1979. Las muestras fueron inicialmente inactivadas a 56 ⁰C durante 30 min, posteriormente se trataron con una solución de albúmina bovina sérica (ABS) al 1% en tampón fosfato salina (PBS) y una suspensión de glóbulos rojos (GR), según el virus en estudio. En el caso del sarampión se emplearon GR de mono verde al 2,5%, de gallo al 50% en el de la parotiditis y de ganso al 50% en el de la rubeola.

La técnica se realizó en placas de fondo U de 96 pocillos (Greiner) para el estudio del sarampión y la parotiditis y de fondo V para el de la rubeola (Greiner). Se realizaron diluciones al doble de los antígenos para su titulación y se consideró como título de los mismos, a la última dilución donde se produjo hemaglutinación, posteriormente se procedió a la verificación de las 4 unidades hemaglutinantes (UH).

Para determinar el nivel de anticuerpos a sarampión y parotiditis, se tomaron alícuotas de 50µl de los sueros previamente inactivados, luego se añadieron 100µl de kaolín y 25µl de la suspensión de GR, se mezclaron e incubaron a TA de 18 a 20 horas y se centrifugaron a 1 200 rpm durante 10 min, recogiendo posteriormente el sobrenadante.

En el caso de la rubeola, una vez inactivados los sueros, se les adicionaron 200µl del tampón pH 9 (NaCl, NaOH, CaCl₂, MgCl₂ , H₂O) con ABS al 0,4% y 250 µl de kaolín y se dejaron en contacto durante 20 min a TA. El sobrenadante fue colectado después de realizar una centrifugación a 1 500 rpm por 10 min.

Posteriormente, se añadieron a partir del segundo pocillo de la placa, 25µl del diluyente (PBS + 0,1% ABS) y 25µl de la muestra ya tratada a los pocillos primero, segundo y al perteneciente al control de suero. Se realizaron diluciones al doble desde el segundo pocillo hasta el quinto y luego se añadieron 25 µl de las 4 UH del antígeno ya verificadas, a todos menos al del control, mezclándose bien e incubándose durante una hora a TA. Posteriormente se adicionaron 25 µl de la suspensión de GR al 0,5% a toda la placa, incubándose durante 2 horas a TA. La dilución inicial del suero en el caso del sarampión y la parotiditis fue de 1:4 y en el de la rubeola de 1:10. Se realizó la lectura de la prueba, considerándose como el título del suero, al recíproco de la dilución final que produjo inhibición de la hemaglutinación.

Criterio de positividad: Se consideró positiva aquella muestra que presentó seroconversión o aumento del título de anticuerpos del segundo suero cuatro veces o más con respecto al primero.

Seroconversión de los sueros pareados al sarampión y la parotiditis: Cuando el título del primer suero (fase aguda) fue menor de 1:4 y mayor o igual a 1:8 en el segundo suero (fase convaleciente). En el caso de la rubeola, cuando el título del primer suero fue menor de 1:10 y mayor o igual a 1:20 en el segundo.

III.2.2. SUMA para detección de anticuerpos totales al virus del sarampión.

Se realizó según el método descrito por Soler y colaboradores en 1992. Se emplearon placas de polivinilo de 96 pocillos (Costar) que fueron sensibilizadas con antígeno de sarampión a una concentración de proteínas de 40 µg/ml. Se añadieron 10 µl del antígeno a toda la placa y se incubó

de 18 a 20 horas a 4 °C en cámara húmeda. Las muestras y sueros controles, se diluyeron 1:40 en la solución tampón (Tris - Tween 20 al 0,05% + suero de carnero al 5%), se distribuyeron 10 µl por pocillo y se incubaron 30 min a 37 °C en cámara húmeda. Se realizaron 4 lavados con el tampón y posteriormente se adicionó el conjugado (anti- inmunoglobulinas totales humanas conjugadas con β galactosidasa (Centro de Inmunoensayo (CIE), C. de la Habana) a una concentración de 1:300, luego se incubó 30 min a 37 °C y se repitió posteriormente el lavado en las condiciones descritas anteriormente. Se añadieron 10 µl de la solución de sustrato fluorigénico (4-metil umbeliferil β d- galactopiranosido, (Koch Light Limited Harveshall, Suffolk / Inglaterra), siendo estimada la fluorescencia en el espectrofluorímetro automático (PR-521).

Criterio de positividad: Se consideró positiva la muestra que presentó seroconversión o aumento del título de anticuerpos del segundo suero cuatro veces o más con respecto al primero.

Seroconversión de los sueros pareados: Cuando el título del primer suero fue menor de 1:40 y mayor o igual a 1:80 en el segundo.

III.2.3. SUMA para la detección de anticuerpos totales al virus de la rubeola.

Se realizó la detección de anticuerpos totales empleando la técnica normalizada por González y colaboradores en 1992. A la placa de poliestireno (Costar) de 96 pocillos recubierta con antígeno de rubeola, se le añadieron 10 µl de muestras de suero diluido 1:40 en el tampón de dilución (Tris - NaCl - Tween 20 + suero de carnero al 20%), luego se incubó a 37 °C por 30 min. Pasado el periodo de incubación, se lavó cuatro veces con la solución de lavado (Tris - NaCl - Tween 20) y se añadió el conjugado 1:1 000 (anti inmunoglobulina humana conjugada con fosfatasa alcalina). Se incubó 30 min a 37 °C y posteriormente se añadieron 10 µl por pocillo del sustrato fluorigénico (4-metilumbeliferil fosfato β d- galactopiranosido). La lectura de la fluorescencia se realizó con el espectrofluorímetro automático (PR-521) y se empleó el programa UMELISA- Rubeola (CIE).

Criterio de positividad: Se consideró positiva la muestra que presentó un valor de corte mayor o igual a 0,21 unidades de fluorescencia.

III.2.4. ELISA para la detección de anticuerpos de tipo IgM al virus del sarampión. (Enzygnost anti-Virus del Sarampión/IgM, DADE Behring, Germany).

Es un ELISA comercial que emplea un principio indirecto, el cual se realizó según las instrucciones del fabricante. Los sueros a investigar se trataron con solución absorbente del factor reumatoideo

(FR), mezclando 200µl de los mismos con 200µl de esta solución, luego se incubaron entre 18 a 20 horas a 4 °C. Posteriormente, se tomaron 150µl de los sueros previamente tratados y de los controles positivos y negativos y se agregaron a la fase sólida recubierta con el antígeno de sarampión y su control (células no infectadas con el virus), se incubó durante 60 min a 37 °C. Pasado este tiempo se realizaron tres lavados con el tampón proporcionado por el estuche.

Se añadieron 100µl de anti-IgM humana conjugada con peroxidasa y se volvió a incubar durante 60 min a 37 °C, para lavarse nuevamente como se había descrito anteriormente. El sustrato tetrametil bencidina (TMB), se añadió a toda la placa a razón de 100µl por pocillo y se incubó durante 30 min a TA al abrigo de la luz. Esta reacción se interrumpió por la adición de la solución de parada, originándose una coloración amarilla cuya intensidad se midió con un filtro de 450nm.

Para cuantificar los anticuerpos de tipo IgM presentes en las muestras estudiadas, se calculó la diferencia de intensidad cromática de los pocillos recubiertos con antígeno y antígeno control,

Criterio de positividad: Se consideró una muestra como positiva, cuando el valor de densidad óptica (DO) fue mayor al valor de corte prefijado (0,2) en el estuche.

III.2.5. ELISA de captura para la detección de anticuerpos de tipo IgM al virus de la rubeola (Rubenostika IgM II, Biomerieux, Suiza).

El sistema comercial Rubenostika IgM II es un ELISA basado en el principio de captura de anticuerpos y se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

A los pocillos de la placa de reacción recubiertos con anti IgM humana (obtenida en oveja), se les añadieron 100µl de las muestras a estudiar y los controles y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Después de lavar en 4 ocasiones con tampón fosfato suministrado en el estuche, se distribuyeron 100 µl del antígeno y del conjugado monoclonal anti-rubeola marcado con peroxidasa de rábano picante y se incubó a 37°C durante 1 hora.

Se lavó nuevamente en 4 ocasiones, se aplicaron 100µl del sustrato TMB y se incubó a 25°C durante 30 min, la reacción se detuvo con ácido sulfúrico 12 M, a razón de 100µl por pozo. La lectura se realizó con un filtro de una longitud de onda de 450 nm.

Criterio de positividad: La intensidad del color fue proporcional a la concentración de anticuerpos de tipo IgM anti-rubeola presentes en la muestra, considerándose como positiva, cuando la absorbancia de la misma fue mayor o igual al valor de corte calculado en la prueba y negativa cuando fue menor que éste.

III.3. Colecta, almacenamiento y envío al laboratorio, de las muestras de suero, exudado nasofaríngeo y orina, empleadas en el estudio.

Muestras de suero. Se colectaron por punción venosa, 10 ml de sangre total, luego se centrifugaron a 1 500 rpm durante 15 min, se extrajeron los suero y se depositaron en viales de 1,5ml (eppendorf), rotulados y sellados, colocándose en envases plásticos herméticamente cerrados, con material absorbente (algodón) en su interior, para evitar el derrame del contenido. Las muestras fueron trasladadas a 4 °C al laboratorio y conservadas posteriormente a menos 20 °C hasta su uso (OMS^b, 2006).

Sueros pareados: Los primeros sueros fueron colectados en la fase aguda de la enfermedad, (quinto día de la fecha de inicio de los síntomas (FIS) y los segundos sueros (fase convaleciente), entre 15 y 21 días después de extraído el primero. Los monosueros empleados en el ELISA/IgM a sarampión y rubeola, fueron tomadas en la fase aguda de la enfermedad.

Muestras de exudado nasofaríngeo. Fueron colectadas en caso de brotes, al quinto día de la FIS. Se emplearon hisopos estériles, tomándose células epiteliales de faringe y nariz, posteriormente fueron colocados en tubos estériles con tapa de rosca que contenían 2ml de PBS y se mantuvieron a 4 °C hasta su llegada al laboratorio, donde las células fueron eluidas en el medio y los hisopos extraídos de los tubos. Se centrifugó a 1 500 rpm durante 10 min a 4 °C y el sedimento se resuspendió en PBS, conservándose a menos 70 °C hasta su empleo (OMS^b, 2006).

Orina. Se colectaron 50 ml de orina en un tubo (eppendorf) estéril y cerrado herméticamente con el fin de evitar el derrame de la muestra y luego se enviaron al laboratorio a una temperatura de 4 °C. Posteriormente se procedió a la centrifugación a 1 500 rpm, durante 10 min a 4 °C, se resuspendió el sedimento en 1 ml de PBS y se guardó a menos 70 °C, hasta su uso. Las muestras fueron recogidas al quinto día de la FIS (OMS^b, 2006).

Las muestras empleadas en el estudio, venían acompañadas de una encuesta epidemiológica donde fueron recogidos los datos de identificación del paciente, así como el cuadro clínico y epidemiológico, los cuales se ven reflejados en el Anexo 1.

Además se confeccionó una base de datos en el programa Excel, donde se recogieron todos los datos de la encuesta epidemiológica y los resultados obtenidos.

Todas las muestras fueron consideradas como un material potencialmente infeccioso y para su colección y manejo, se cumplieron con los procedimientos normalizados de bioseguridad, según los requisitos orientados por la OMS (OMS^a, 2004).

III.4. Materiales y métodos específicos de cada estudio.

III.4.1. Procedimientos establecidos en el laboratorio para la vigilancia de PRS. Cuba 1988/2007.

III.4.1.1. Métodos.

Se realiza la descripción de los diferentes algoritmos de trabajo establecidos en el LNR de PRS del IPK, durante los años 1988 al 2007, para la integración de la vigilancia de laboratorio al programa de eliminación de estas tres enfermedades.

III.4.2. Introducción del ELISA/IgM para el diagnóstico del sarampión. Cuba 1995.

III.4.2.1. Muestras serológicas. Se estudiaron 60 pares de suero procedentes de la vigilancia seroepidemiológica del sarampión y la rubeola, que llegaron al LNR en el período comprendido entre enero y mayo de 1995.

III.4.2.2. Técnicas Empleadas.

III.4.2.2.1. ELISA indirecto para la detección de anticuerpos de tipo IgM al virus del sarampión (Clark Laboratories INC. Measles IgM ELISA, EEUU).

Es un sistema comercial que emplea un principio indirecto y se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras a estudiar fueron diluidas con el tampón suministrado por el estuche (20µl de la muestra + 400µl de tampón), luego se tomaron 200 µl de las mismas y se les agregaron 200µl de la solución absorbente del FR, la mezcla fue incubada durante 20 min a TA. Posteriormente se adicionaron 100µl a la fase sólida recubierta con antígeno y antígeno control y se realizó una incubación durante 1 hora a 37 °C.

Se efectuaron tres lavados, se agregaron 100µl del conjugado anti-IgM humana a cada pocillo y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Se lavó la placa de reacción como se describió anteriormente y se añadieron 100µl del sustrato TMB, se realizó una incubación de 30 min a TA al abrigo de la luz.

La reacción se detuvo por la adición de 100 µl de la solución de parada, dando origen a una coloración amarilla cuya intensidad se midió con un filtro de una longitud de onda de 450nm.

Criterio de positividad: Se consideró la muestra positiva de anticuerpos, cuando presentó un valor de DO mayor o igual a 0,2.

III.4.2.2.2. IFI para la detección de anticuerpos de tipo IgM a los virus del sarampión y la rubeola.

Se prepararon láminas de fluorescencia de 10 pocillos (ICN Biomedicals, Inc.), a las cuales se les añadieron 10 µl de células VERO infectadas con los virus del sarampión o el de la rubeola y de células no infectadas como control, posteriormente se procedió a fijar las mismas con acetona durante 1 hora a menos 20°C y se dejaron secar a TA. Luego se le añadieron 10 µl de las muestras previamente tratadas con solución absorbente del FR (Behringher) (20 µl de la muestra + 20 µl del FR) y se incubaron a 37°C durante tres horas. Pasado este tiempo, las láminas se lavaron con PBS y se les adicionó el conjugado anti- IgM humano marcado con fluoresceína (BIOCEN, Cuba); se tiñeron con azul de Evans y se incubaron a 37°C durante 30 min. Posteriormente se volvieron a lavar tres veces con PBS, se secaron y se observaron al microscopio de fluorescencia (Leica) (Knapp y cols, 1978).

Criterio de positividad: Se consideró una muestra positiva de anticuerpos, cuando se encontró fluorescencia en el citoplasma de las células infectadas y ausencia de ésta en las células sin infectar.

III.4.2.2.3. Detección de anticuerpos neutralizantes al virus del sarampión (micrométodo).

Se realizó la microneutralización según el método descrito por Gershong y Krugman, en 1979. Para la titulación del virus del sarampión, se emplearon placas de 96 pocillos (Costar) de fondo plano con una monocapa confluyente de células VERO, preparadas previamente en el departamento de Cultivos Celulares del IPK, luego se realizaron diluciones desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁸ del mismo y se inocularon 25 µl de estas diluciones en cada pocillo de la placa, las 100 TCID₅₀ se correspondieron con la dilución 10⁻⁶.

Posteriormente, las muestras de sueros pareados a estudiar, se diluyeron desde 1:4 hasta 1:64 y se añadieron 25 µl de cada una de ellas y de las 100 TCID₅₀ del virus, a la placa de microtitulación, dejándose en contacto durante una hora a 37°C en atmósfera de CO₂ al 4 %. Transcurrido este tiempo, se añadieron 50 µl de la suspensión de células VERO a todos los pocillos de la placa y se incubó nuevamente a 37 °C con CO₂. Al quinto día después de la inoculación, se observó el ECP característico en el control viral y se procedió a la lectura de las placas empleando el microscopio invertido (Leica). Cada lote de prueba se acompañó de controles de células, de toxicidad del suero y de dosis de cada virus.

Criterio de positividad: Se consideraron positivos de infección con el virus del sarampión, aquellos casos cuyos pares de suero presentaron seroconversión (título del suero de fase aguda menor de 1:4 y mayor o igual a 1:8 el de la fase convaleciente) o cuando hubo incremento en el título de anticuerpos de cuatro veces o más del segundo suero con respecto al primero.

III.4.2.2.4. IFI para la detección de anticuerpos de tipo IgG al citomegalovirus (CMV), Virus Herpes Simple (VHS), VCA (Antígeno de la cápside viral, siglas del inglés, Viral Capsid Antigen) y EA (Antígeno temprano, siglas del inglés Early Antigen) del VEB.

En la detección de anticuerpos de tipo IgG al CMV, VHS y al VEB, se empleó el método realizado por Alvarez y colaboradores en 1989. Para conocer la presencia de anticuerpos de tipo IgG al CMV, las láminas de inmunofluorescencia (ICN Biomedicals, Inc.), fueron fijadas con células de pulmón humano (PH) y se inocularon con la cepa de referencia AD 169 (Instituto Pasteur, Paris, Francia). En el caso del VHS, fueron fijadas con células VERO infectadas con la cepa 127 de VHS tipo 1, (obtenida de una lesión bucal, aislamiento en células VERO, IPK, 1992) y para la detección de la IgG contra VCA y el EA del virus VEB, se utilizaron células P3HR1 (Linfoma de Burkitt, Ascitis, ATCC, Rockville, Maryland, EEUU) como fuente de antígeno.

Los sueros a estudiar fueron diluidos desde 1:20 hasta 1:1 280 y se añadieron 10 µl de los mismos a las láminas de fluorescencia, luego se incubaron durante 30 min a 37 °C. Posteriormente se añadieron a cada uno de los pocillos, 10 µl del conjugado (Inmunoglobulinas de conejo anti humanas, Biocen, Cuba) marcado con isotiocianato de fluoresceína y se volvió a incubar a 37 °C, 45 min. La lectura se realizó en un microscopio de fluorescencia (Leica).

Para la detección del EA del VEB, se realizó el anterior procedimiento y los sueros a estudiar fueron diluidos 1:5 solamente.

Criterio de positividad: Se consideró como título de anticuerpos IgG al CMV, HSV y a VCA del VEB, a la última dilución del suero en la cual se detectaron anticuerpos fluorescentes intranucleares. El criterio para considerar a una muestra positiva a EA del VEB fue la observación de al menos una célula fluorescente por campo.

III.4.3. Vigilancia de laboratorio a los virus del sarampión, la rubeola y la parotiditis. Cuba 1988/2007.

III.4.3.1. Muestras serológicas.

Se realizó el estudio de 15 199 y 15 462 muestras de suero (sueros pareados y monosueros), con el diagnóstico probable de sarampión y rubeola respectivamente y 18 382 sueros pareados diagnosticados como parotiditis. Todas estas muestras fueron enviadas al LNR de PRS del IPK, para la vigilancia seroepidemiológica a estos virus, procedentes de todas las provincias del país, entre los años 1988 al 2007.

Las muestras que arribaron con el diagnóstico de sarampión, se les realizó determinación de anticuerpos al virus de la rubeola y viceversa.

III.4.3.2. Técnicas Empleadas.

Para realizar el estudio se emplearon las técnicas previamente descritas en los acápites III.1 (Sub acápites III.1.1 y III.1.2) y en el acápite III.2 (III.2.1, III.2.2, III.2.3, III.2.4 y III.2.5).

III.4.4. Estudio de seroprevalencia de anticuerpos a PRS en una población comprendida en las edades entre 7 meses y 23 años. Cuba 1999.

III.4.4.1. Muestras serológicas.

Se realizó una encuesta seroepidemiológica representativa de la población cubana, en la cual se estudiaron 1 593 muestras de suero, pertenecientes a personas entre 7 meses y 23 años, supuestamente sanos, de las cuales se extrajeron 10ml de sangre periférica por punción venosa, obteniéndose el suero, según el procedimiento descrito en el acápite III.3.

Para la selección de la muestra se calculó la prevalencia de seropositividad con una precisión relativa, un estimado de esa prevalencia con un error relativo de casi un 4% y un nivel de confiabilidad de un 95%. Se determinaron por grupos de edades diferentes tamaños de muestras necesarios para el estudio según la Tabla 2a de Lwanga y Lemeshow en 1991.

Se realizó un muestreo por conglomerados por provincias y se decidió tomar de forma aleatoria seis provincias, de cada una de ellas se seleccionaron por muestreo aleatorio simple tres municipios y de cada uno se escogieron 2 policlínicos o el único policlínico municipal.

Después de estratificadas las muestras , se agruparon en 6 grupos de edades para realizar el estudio (< 1 año, 1 año, 2-5 años, 6-10 años, 11-15 años y 16 - 23 años), esta selección se realizó teniendo en cuenta la edad de vacunación con la triple viral en el PNI y la diferentes estrategias de eliminación implementadas en el país.

III.4.4.2. Datos para la colección de la muestra.

Para la colección de la muestra se diseñó una encuesta que se muestra en el Anexo 2.

III.4.4.3. Técnicas Empleadas.

En este estudio se preparó el antígeno de PRS según las técnicas descritas en el acápite III.1 (III.1.1 y III.1.2) y se realizó la IH para la detección de anticuerpos a estos virus, encontrándose el protocolo en el acápite III.2 (III.2.1).

III.4.5. Diagnóstico de un brote de rubeola. Cuba 2004.

III.4.5.1. Muestras serológicas.

En el mes de febrero del 2004 fueron estudiados en el laboratorio un total de 111 monosueros de casos con sospecha clínica de infección con el virus de la rubeola, pertenecientes a 67 estudiantes venezolanos y 44 trabajadores cubanos de las Escuelas de Trabajadores Sociales (ETS) de Santiago de Cuba, Ciudad de la Habana y Villa Clara.

III.4.5.2. Técnicas Empleadas:

Se realizó la detección de anticuerpos de tipo IgM a la rubeola y el sarampión con la técnica ELISA, descrita en el acápite III.2 (III.2.4 y III.2.5).

III.4.6. Determinación de la avidez de los anticuerpos de tipo IgG en el suero de trabajadores cubanos involucrados en el brote de rubeola de 2004.

III.4.6.1. Muestras serológicas.

Se realizó la detección de la avidez de la IgG a las muestras de suero de trabajadores cubanos de las ETS de Santiago de Cuba y Ciudad de la Habana. Se estudiaron 17 primeros sueros pertenecientes a estos trabajadores, los cuales eran ELISA/IgM positivos y 15 segundas muestras de suero de estos mismos individuos.

III.4.6.2. Técnicas Empleadas.

III.4.6.2.1. ELISA para detección del índice de Avidez Relativo (IAR)(porcentaje de avidez) de los anticuerpos de tipo IgG al virus de la rubeola.

Para medir la avidez de la IgG, se empleó el estuche comercial Avidity Anti- Rubella ELISA (IgG) (EUROIMMUN, Medizinische Labordiagnostika AG, Holanda), con un principio indirecto y en el cual se siguieron las instrucciones del fabricante.

A todos los pocillos de la placa de reacción se les adicionaron 100µl de las muestras a estudiar y en esta misma placa se realizó la técnica ELISA, de una manera convencional y añadiendo 200 µl de una solución de urea entre la incubación de la muestra y la adición del conjugado (anti IgG humana marcada con peroxidasa), en hileras alternas. Se incubó una hora a 37 °C y después de realizar los lavados con el tampón fosfato suministrado en el estuche, se procedió a aplicar 100 µl del cromógeno TMB/sustrato, el cual se incubó durante 15 min a TA, protegido de la luz. La reacción se detuvo posteriormente con la solución de parada. La lectura se realizó con los filtros de 450 y 620nm como referencia, en un lector de ELISA (Reader 25, Biomerieux).

El IAR se calculó dividiendo la DO de la muestra tratada con urea, entre la DO de la muestra sin tratar y luego se multiplicó por 100.

$$\text{IAR} = \frac{\text{DO muestra tratada con urea}}{\text{DO muestra sin tratar con urea}} \times 100$$

Interpretación de los resultados.

El límite superior del rango considerado como anticuerpos de baja avidez (Valor de Corte) recomendado en el estuche fue del 40%. Valores de IAR por debajo del corte fueron indicativos de anticuerpos de baja avidez (< 40%), entre el 40% y el 60% como moderados y los valores mayores del 60% como de alta avidez.

Aquellas muestras que después de tratadas presentaron DO por debajo de 0,150, no se les realizó detección del IAR, siendo consideradas como no detectables (ND).

Criterio de infección primaria: Aquellos casos donde el valor del IAR fue considerado como moderado, por debajo del valor limite o no pudo ser detectado.

Criterio de infección secundaria: Aquellos casos donde el valor del IAR fue alto (> del 60%).

III.4.7. Diagnóstico de brotes de parotiditis. Cuba 2004/2007.

III.4.7.1. Muestras Clínicas.

Se estudiaron 6 937 muestras de sueros pareados de personas con un diagnóstico clínico de infección con el virus de la parotiditis que llegaron al LNR del IPK en los años del 2004 al 2007 y 15 exudados nasofaríngeos e igual número de muestras de orina, las cuales fueron colectadas en el brote del 2004 y conservadas a menos 20⁰ C hasta su uso.

III.4.7.2. Técnicas Empleadas.

Para la detección de los anticuerpos IH al virus de la parotiditis, se emplearon las técnicas descritas en los acápite III.1 (III.1.1) y III.2 (III.2.1).

III.4.7.2.1. Aislamiento del virus de la parotiditis en muestras de exudado nasofaríngeo y orina.

Se empleó el método descrito por Utz y colaboradores en 1957. Para realizar el aislamiento viral se utilizó la línea celular VERO cultivada en frascos plásticos de 25 cm² (Corning) en el departamento de Cultivos Celulares del IPK. Las células fueron inoculadas con 100µl de las muestras a estudiar (exudado nasofaríngeo, orina) y luego se incubaron a 37⁰ C durante 1 hora. Posteriormente se agregaron 10 ml de medio de crecimiento 199 que contenía un 2% de SFB más antibióticos (penicilina y estreptomycin al 0,1%) y glutamina al 2%, para el mantenimiento de las células.

A las 72 horas se realizó un cambio de medio, pero sin SFB, se volvieron a incubar a 37⁰ C y se continuó observando diariamente hasta que se produjo el ECP (sincitios o desprendimiento de la monocapa) típico del virus de la parotiditis. Posteriormente se procedió a la identificación del aislamiento.

III.4.7.2.2. Técnica de TR-RCP para amplificar el genoma del virus de la parotiditis.

Esta técnica se empleó para la identificación de los aislamientos virales y para el diagnóstico directo de la muestra de exudado nasofaríngeo y orina de los pacientes. El protocolo de las técnicas fue descrito por Lizuka y colaboradores, en 2001.

III.4.7.2.2.1. Extracción del ARN viral.

Se tomaron 200µl de las muestras a estudiar y se depositaron en un tubo eppendorf de 1,5 ml, se homogeneizó manualmente y se añadieron 800µl de Trizol ® (Invitrogen). Esta mezcla se dejó reposar durante 5 min, finalizado este tiempo, se adicionaron 200µl de cloroformo (Sigma), se agitó vigorosamente durante 1 min y se centrifugó a 13 000 rpm durante 20 min en una centrífuga

(Eppendorf) a 4 °C. La fase acuosa obtenida como resultado de la centrifugación, fue transferida a un nuevo tubo eppendorf, al cual se le agregaron 400µl de isopropanol (Sigma) y una vez mezclado por agitación manual, se dejó reposar durante 10 min a TA. Posteriormente se centrifugó con las condiciones descritas anteriormente y se desechó la fase acuosa, se añadió 1ml de etanol (Sigma) al 75%, se mezcló y centrifugó nuevamente de igual forma que las veces anteriores. Después de eliminar todo el etanol residual, el precipitado se dejó secar completamente a TA y luego se resuspendió en 20µl de agua dietilpirocarbonatada (Sigma).

III.4.7.2.2. Técnica de Transcripción Reversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa (TR-RCP).

Inicialmente se realizó la transcripción reversa, para lo cual se preparó la mezcla de reacción con el tampón constituido por 50mM Tris HCl, pH8,3; 75mM KCL, 2mM MgCl₂, 10 unidades de enzima reverso transcriptasa (RT) (23U/µl Roche), 10nmol de cada deoxinucleótido trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Roche) y 1µl del oligonucleótido 8152(5' AACCAACTCGTTGAGCAAGG3'), se completó con agua bidestilada libre de nucleasas para un volumen final de 20 µl y se añadieron 10 µl del ARN previamente extraído. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Modelo PTC 100TM. MJ Research, Inc.) y se realizó un ciclo a 95 °C / 2 min, 42 °C / 45 min y 95 °C / 5 min.

Posteriormente se tomaron 5 µl de la mezcla del producto de la RT y se adicionaron 0,5 µl de la enzima Taq ADN Polimerasa (5 U/µl Roche), 5µl del tampón de la Taq, 1 µl de dNTP, 1 µl de cada uno de los oligonucleótidos 8151 (5' TGAACCTGTTGGTTGGATAG3') y 8152 y se añadió agua libre de nucleasas a completar un volumen de 50 µl. Después de los cuatro primeros minutos a 94 °C de desnaturalización, se realizaron 35 ciclos de amplificación (94 °C / 1 min, 44 °C / 1.5 min, 72 °C / 1 min), seguidos por 7 min de extensión a 72 °C.

Para realizar la RCP anidada, se tomó 1 µl del producto de la primera RCP, el cual se unió a una mezcla idéntica a la anteriormente descrita y con igual programa de amplificación, pero empleándose esta vez los oligonucleótidos 8153 y 8154 (5' TAC TCA TTG GCA ATC CAG AG3' y 5' TCC TGA TAA ACG GTG GTG AC3') respectivamente.

Los oligonucleótidos empleados son específicos de la región del genoma del virus que codifica para la proteína P del virus de la parotiditis, generando una banda de 199 pb y fueron elaborados en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB, C. Habana, Cuba).

La corrida electroforética se realizó a 90V durante 2 horas y el producto de la RCP fue visualizado en un gel de agarosa al 2% en tampón tris borato, Etilén Diamino Tetracético (EDTA) (TBE 1X), teñido con bromuro de etidium. Se empleó un marcador de peso molecular (100bp DNA ladder, Promega) y se observó la banda específica del virus por exposición del gel a la luz ultravioleta en el transiluminador.

III.5. Análisis estadístico.

Para conocer la significación estadística de los casos positivos en la vigilancia a PRS, durante 1988 al 2007 y en el diagnóstico del brote de rubeola del 2004, se empleó la prueba de probabilidad exacta de Fisher.

Se utilizó el paquete estadístico GraphPad Prism 5.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA, 2007), en el estudio de seroprevalencia de anticuerpos a PRS, en una población comprendida entre 7 meses a 23 años. Como medida de asociación de los resultados obtenidos se calculó el intervalo de confianza (IC 95%), se procedió al cálculo de la significación estadística mediante la prueba paramétrica (t tests) contenida en el programa y se realizó la determinación del Título Promedio Geométrico (TPG) realizando la transformación logarítmica de los títulos obtenidos por IH, calculándose la media aritmética, las cuales se compararon para detectar diferencia significativa entre los títulos de anticuerpos en cada grupo estudiado, usando el análisis de varianza (ANOVA).

III.6. Consideraciones éticas de la investigación.

Todos los estudios que forman parte de este documento, fueron sometidos a la consideración de la Comisión de Ética Médica y Revisión del IPK y conducidos de acuerdo a las revisiones de la Declaración de Helsinki de la 18ª Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, junio 1964 y enmendada por la 29ª Asamblea Médica Mundial, Tokio, Japón, octubre 1975; la 35ª Asamblea Médica Mundial, Venecia, Italia, octubre 1983; la 41ª Asamblea Médica Mundial, Hong Kong, septiembre 1989 y la 48ª Asamblea General Somerset West, Sudáfrica, Octubre 1996.

En los estudios realizados, se empleó el banco de muestras clínicas (suero, exudados nasofaríngeos y orinas) del laboratorio, procedentes de la vigilancia de PRS. En la encuesta epidemiológica se recogió el consentimiento informado de los participantes, padres o tutores (Anexo 3).

A todas las personas implicadas se les informó sobre los propósitos científicos y sociales de las investigaciones a realizar, predominando los principios de voluntariedad, beneficencia y confidencialidad.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. Procedimientos establecidos en el laboratorio para la vigilancia de PRS. Cuba 1988/2007.

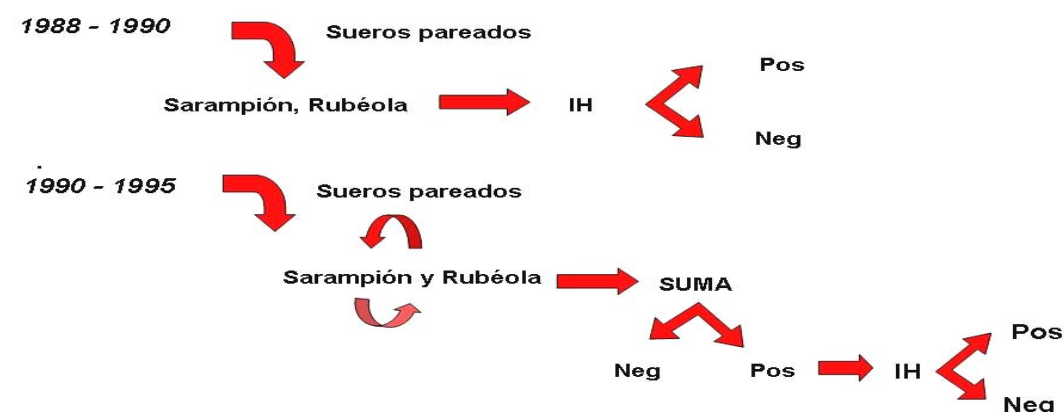
Para incorporar la vigilancia de laboratorio al programa de eliminación de estas enfermedades, se establecieron varios algoritmos de trabajo, los cuales se fueron modificando a medida que se aplicaron diferentes estrategias en la toma de la muestra y nuevas técnicas aplicadas al diagnóstico, lo que permitió un incremento en la calidad del resultado y una disminución en el tiempo en la obtención de los mismos.

IV.1.1. Algoritmos de trabajo del laboratorio para el diagnóstico de PRS.

Los algoritmos desarrollados en el laboratorio se realizaron en tres periodos diferentes, desde 1988 a 1990, de 1990 a 1995 y a partir del año 1995 hasta el 2007.

Entre los años 1988 y 1990, se recibieron y estudiaron muestras de sueros pareados, pertenecientes a pacientes con el diagnóstico de síndrome febril con erupción, sospechosos de padecer sarampión o rubeola. Durante este periodo, el diagnóstico de estas enfermedades se realizó a través de la técnica IH, que permitió detectar seroconversión o aumento en cuatro veces o más del título de anticuerpos del segundo suero con respecto al primero. Desde 1990 hasta 1995, debido a la similitud de las características clínicas, investigaciones epidemiológicas y las técnicas empleadas en el laboratorio para el diagnóstico de ambas enfermedades, se decidió desarrollar una vigilancia integrada de estos virus, donde los casos de sarampión eran estudiados como rubeola y viceversa (Figura 3).

En este periodo se siguieron recibiendo muestras de sueros pareados y se comenzó a aplicar el SUMA para la detección de anticuerpos totales. Esta técnica permitió automatizar el diagnóstico, disminuyendo el tiempo de realización del ensayo; además, resultó ser mas económica, porque se empleó un menor volumen (10µl) de muestra y reactivos, no obstante, mostró tener una especificidad baja, por lo que todos los casos positivos fueron confirmados por IH (González y cols, 1992; Soler y cols, 1992).

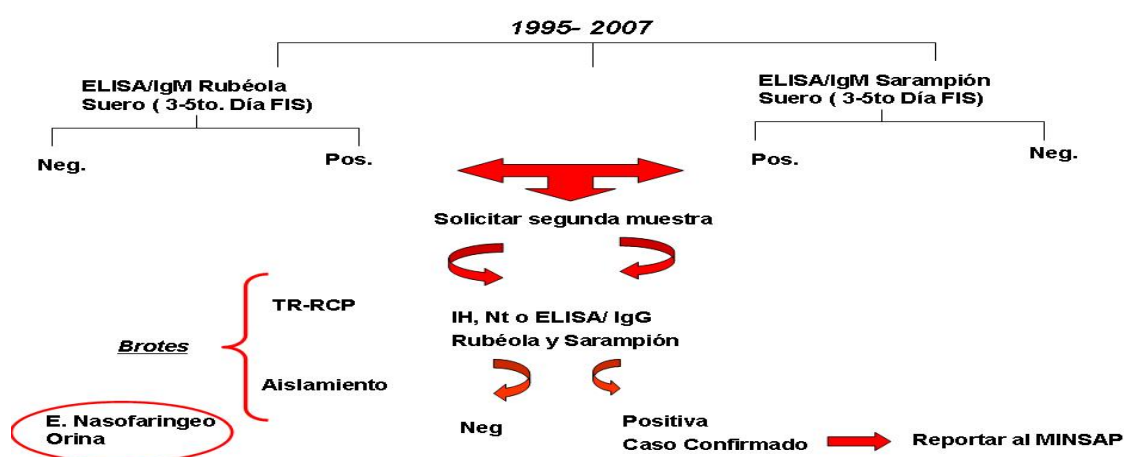


Según los Procedimientos Normalizados de Operaciones (PNO) del laboratorio.

Figura 3. Algoritmo de trabajo para el diagnóstico de muestras sospechosas de sarampión y rubéola

La necesidad de seguir tomando este tipo de muestras para realizar las técnicas anteriormente mencionadas y la demora que se producía en la extracción del segundo suero, retardaban la confirmación del caso.

A partir de 1995 (Figura 4), se introduce en el laboratorio la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos de tipo IgM al virus del sarampión primeramente y luego al de la rubéola, llegando muestras que correspondían a casos probables de la enfermedad.



Según PNO del laboratorio.

Figura 4. Algoritmo de trabajo para casos probables de sarampión y rubéola

La introducción de este sistema permitió disminuir el tiempo en la obtención de los resultados, ya que al paciente sólo se le tomaba una muestra de suero entre el tercer y quinto días de iniciada la erupción. No obstante, a toda persona positiva, se le realizó una segunda extracción de sangre entre 15 a 21 días después de la primera, con el objetivo de realizar la confirmación por IH, Nt ó ELISA/IgG.

Sólo en los brotes se colectaron además, muestras de exudado nasofaríngeo y orina, en las cuales se intentó realizar el aislamiento viral y aplicar las técnicas de biología molecular (TR-RCP), por ser sensibles y específicas y por la necesidad de contar con herramientas y avances tecnológicos para hacer el diagnóstico más rápido, eficiente y preciso.

IV.1. 2. Algoritmo de trabajo del laboratorio para el diagnóstico del SRC.

En Cuba, la vigilancia de laboratorio del SRC está integrada a la de rubeola y se reciben muestras de suero de neonatos, hijos de madres con sospecha de infección por este virus y de aquellos que presentan manifestaciones clínicas compatibles con el de síndrome de TORCH (Toxoplasma, Rubeola, CMV y Herpes).

A todos estos casos se les realizó igual algoritmo que el empleado en el diagnóstico de rubeola y en aquellos neonatos en los cuales se observó una respuesta de anticuerpos de tipo IgM positiva, se les solicitaron muestras de orina y exudado nasofaríngeo para la realización de la TR-RCP y el aislamiento viral (Figura 5).



Figura 5. Algoritmo de trabajo para el diagnóstico del SRC.

Al estudiar las muestras de estos pacientes, no se encontraron casos positivos al virus de la rubeola. Resultados similares fueron reportados por Abdel-Fattah y colaboradores en Inglaterra, donde analizaron

462 muestras de suero de pacientes con síndrome de TORCH, no encontrando casos positivos a rubeola, planteando que la presencia de SRC disminuye rápidamente después de implementada la vacunación contra este virus como parte del programa de inmunización (Abdel-Fattah y cols, 2005)

En países donde se aplicó la vacunación contra la rubeola por varios años y se realizaron campañas en mujeres en edad fértil, el impacto se vio reflejado en la disminución de la incidencia de esta enfermedad y del SRC, sin embargo, como la transmisión de la rubeola continuó, la vacunación fue indicada también en adolescentes y adultos del sexo masculino (Castillo y de Quadros, 2002; OMS^d, 2008).

En Cuba se reportaron epidemias de rubeola en los años 1967, 1973 -1974 y 1981, llegándose a producir alrededor de 1 200 casos de SRC. A partir del año 1982, las autoridades de salud decidieron realizar diferentes estrategias de vacunación para controlar esta enfermedad, entre las que estaba vacunar a las adolescentes y mujeres en edad fértil e incorporar la vacuna triple viral al programa de inmunizaciones, cuyo impacto se reflejó en el control de la rubeola y el diagnóstico del último caso de SRC en 1989 (MINSAP^c 1999, Castillo y de Quadros, 2002).

IV.1. 3. Algoritmo de trabajo del laboratorio para el diagnóstico de la parotiditis.

Desde el año 1988 hasta 2007, llegaron al laboratorio muestras de sueros pareados de casos probables de estar infectados con el virus de la parotiditis.

Para el diagnóstico serológico de esta enfermedad, se aplicó la técnica de IH y en caso de brotes, se tomaron muestras de exudado nasofaríngeo y orina para realizar el aislamiento viral en cultivo celular y la TR-RCP (Figura 6).

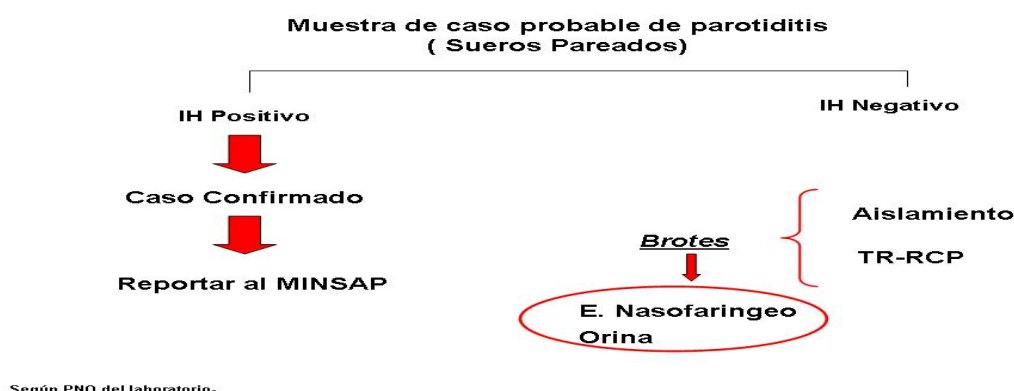


Figura 6. Algoritmo de trabajo del laboratorio para el diagnóstico de parotiditis

Una vez obtenidos los resultados de las muestras estudiadas en la vigilancia de estas tres enfermedades, fueron reportados a las autoridades nacionales y provinciales de salud (Vice dirección de Higiene y Epidemiología) a través de la vía telefónica, con el uso del correo electrónico y los informes mensuales de la vigilancia. Se plantea, que la retroalimentación debe ser oportuna e informativa, proporcionando los resultados obtenidos en las investigaciones epidemiológicas y de laboratorio realizadas, mostrando la importancia del mantenimiento de la vigilancia de estas enfermedades (Roush y cols, 2008).

El algoritmo de trabajo en la vigilancia de laboratorio de PRS establecido en Cuba, a medida que fue incorporándose la vacuna triple viral al programa de vacunación, permitió responder ante cualquier evidencia de transmisión de alguna de estas enfermedades.

En general, los indicadores de laboratorio revelaron un nivel de competencia adecuado, ya que el 100% de los casos notificados se estudiaron en las primeras 48 horas de su arribo al laboratorio y se les realizaron las investigaciones pertinentes, aumentó la calidad de la muestra serológica, siendo recogida dentro de los tres primeros días de iniciada la erupción, mientras que los exudados nasofaríngeos y orinas que se emplearon en el aislamiento viral y estudios moleculares, sólo fueron colectados en caso de brotes, pero las condiciones de transporte y conservación para su envío al laboratorio, no siempre fueron las recomendadas. Se incorporaron al diagnóstico iguales técnicas que las empleadas en los otros países de la región y se realizaron las pruebas de proficiencia serológica enviadas por la OPS con resultados satisfactorios.

No obstante, la recogida de los datos de la encuesta no se realizó de una manera uniforme, por lo que muchas de ellas no reflejaron la información necesaria, la cual es importante para conocer el origen de la infección, posibles contactos, realizar intervenciones y evitar la diseminación de la enfermedad (Roush y cols, 2008).

El 80% de las muestras de suero no llegaron al laboratorio en los cinco días posteriores a su recogida, debido a demoras en el envío desde el lugar de su colecta hasta el LNR del IPK. Para mantener un adecuado control de los casos desde el punto de vista epidemiológico y de laboratorio, es necesario el cumplimiento de todos los indicadores, considerándose necesario, para aumentar la calidad de la vigilancia, una mayor coordinación y comunicación entre los médicos de asistencia, epidemiólogos y personal de laboratorio.

Al igual que en Cuba, la vigilancia de laboratorio a PRS también fue implementada en otros países del área como son Estados Unidos, Brasil, Costa Rica y los países del Caribe Inglés, entre otros, ya que se reconoció la importancia de la confirmación por parte del laboratorio de los casos

sospechosos de estas enfermedades. Asumiendo todos la responsabilidad de la recepción, manejo y procesamiento de las pruebas de diagnóstico, interpretación y reporte de los resultados, así como la participación en los programas de control de calidad (Irons y cols, 2000; Fullerton y Reef, 2002; Venczel y cols, 2003; Morice y cols, 2003).

IV.2. Introducción del ELISA / IgM al diagnóstico serológico del virus del sarampión. Cuba 1995.

La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos en los 60 pares de sueros estudiados. Se observó que todas las muestras fueron negativas por la técnica IH y en el caso del ELISA IgM, los primeros sueros de 3 (5%) de los pares, fueron positivos.

Tabla 2. Resultados del ELISA/IgM y la IH al virus del sarampión en las muestras de sueros pareados estudiadas.

Técnicas Empleadas	Positivos		Negativos	
	No.	%	No.	%
IH	0	0	60	100
IgM-CLARK	3*	5	57	95

Fuente: Laboratorio Nacional de Referencia PRS / IPK

* Primeros sueros

Los tres casos cuyas primeras muestras eran positivas con el ELISA, se consideró que estaban en fase aguda de la enfermedad, debido a que en el sarampión, los anticuerpos de tipo IgM aparecen rápidamente después de iniciada la erupción, lo que es indicativo de un proceso en su estadio inicial (Dietz y cols, 2004; OPS^b, 2005). Estas muestras fueron estudiadas con la técnica de IFI para la detección de anticuerpos de tipo IgM, siguiendo las recomendaciones del estuche comercial Clark, de analizar los casos dudosos y positivos empleando la misma. Se les realizó además, la neutralización al virus del sarampión, siendo negativos los resultados obtenidos con ambos procedimientos.

A pesar de que el ELISA para la detección de anticuerpos de tipo IgM al virus del sarampión, mostró ser lo suficientemente sensible para detectar la aparición de casos autóctonos e importados, así como, casos esporádicos, durante periodos de ausencia o baja transmisión de la enfermedad, con el empleo de esta técnica se encontraron resultados falsos positivos en ensayos indirectos, donde la interferencia del FR juega un papel fundamental (Bellini y Helfand, 2003).

En el estudio realizado, los 3 sueros IgM positivos fueron considerados como resultados falsos del sistema, siendo una de las causas la interferencia del FR, independientemente de que las muestras fueran previamente tratadas con la solución absorbente. Diferentes autores plantearon la necesidad de realizar el tratamiento con esta solución en más de una ocasión, ya que un método ideal para eliminar el factor, no ha sido reportado (Meurman y cols, 1978; Tuokko, 1984).

Resultó de gran interés conocer, si la presencia de los falsos positivos estaba relacionada con la infección de estas personas con otros virus tales como, el de la rubeola, VEB, CMV y VHS, ya que en diferentes estudios se plantea la existencia de una respuesta de anticuerpos de tipo IgM inespecífica, cuando se producen infecciones con agentes no relacionados con el virus del sarampión (Ratnam y cols, 2000; Navoltropo y cols, 2006).

Estos resultados se muestran en la Tabla 3, donde se observa que el primero de los tres pares estudiados, estuvo infectado con el VEB, ya que fue positivo a EA y presentó aumento de cuatro veces del título de anticuerpos del segundo suero con respecto al primero a VCA. En los pares segundo y tercero, no se encontró positividad a ninguno de los virus estudiados anteriormente, considerándose, que la presencia de los anticuerpos IgM pudo estar relacionada con el FR o con otros virus no estudiados.

Tabla 3: Detección de anticuerpos IgG a los virus de la rubeola, EBV, CMV y VHS en los 3 pares de sueros positivos al virus del sarampión por ELISA/IgM.

<i>Pares de suero</i>	<i>Rubeola</i>	<i>EA</i>	<i>VCA</i>	<i>CMV</i>	<i>VHS</i>
<i>1</i>	-10 / 10	Pos	20 / 80	80/80	80/80
<i>2</i>	10 / 10	Neg	80 / 80	320/ 320	80 / 80
<i>3</i>	10 / 10	Neg	80 / 80	80 / 80	80 / 80

Fuente: Laboratorio Nacional de Referencia PRS / IPK

Ratnam y colaboradores en 2000, estudiaron 20 muestras de suero las cuales presentaron respuesta de anticuerpos de tipo IgM a sarampión o rubeola y a otros virus a la vez, tales como el VHS, CMV y VEB, siendo mayor el número de casos IgM positivos a este último. Este autor planteó, que estos

microorganismos son moduladores no específicos de la respuesta inmune, causando incremento o depresión en la formación de anticuerpos para antígenos no relacionados.

Otra de las causas de respuesta inespecífica de anticuerpos de tipo IgM, es el proceso de reactivación de virus heterólogos, la estimulación selectiva de células B de memoria por antígenos relacionados o la estimulación policlonal de células B durante la infección viral (Bellini y Helfand, 2003; Griffin B y cols, 2010; Rowe y Zuo, 2010).

Se plantea, que el ELISA / IgM indirecto puede ser indicativo de positividad en el sarampión agudo, sobre todo en aquellos lugares donde existe una prevalencia alta y durante brotes, sin embargo, la caída del valor predictivo positivo de los estuches empleados en el diagnóstico, trajo como resultado el aumento del número de falsos positivos en aquellos países donde existe una cobertura de vacunación elevada y está controlada la enfermedad. En estos casos, para lograr un diagnóstico adecuado, es imprescindible hacer uso de la definición de caso, así como implementar la toma de la segunda muestra de suero en la fase convaleciente, con el fin de realizar técnicas confirmatorias tales como la IH, el ELISA para detección de anticuerpos de tipo IgG o de la avidez de la IgG (PAHO, 2005; Navoltropo y cols, 2006; Vicari y cols, 2006).

IV.3. Vigilancia de laboratorio a los virus del sarampión, la rubeola y la parotiditis. Cuba 1988/2007.

IV.3.1. Vigilancia de laboratorio al sarampión. Cuba 1988/2007.

Desde el año 1988 al 2007, fueron estudiadas 15 199 muestras de suero (pareados y monosueros) pertenecientes a pacientes con un diagnóstico de sarampión o rubeola, para ello se emplearon las técnicas IH, SUMA y el ELISA para la detección de anticuerpos de tipo IgM a estas dos enfermedades. Se confirmaron 73 muestras positivas al virus del sarampión para un 0,45%.

Como se puede observar en la Figura 7, el porciento de muestras positivas fue disminuyendo en los diferentes años de estudio desde un 16% en 1988 a 0,3% en 1993, año en que el laboratorio confirmó los dos últimos casos de esta enfermedad en el país ($p < 0,0001$).

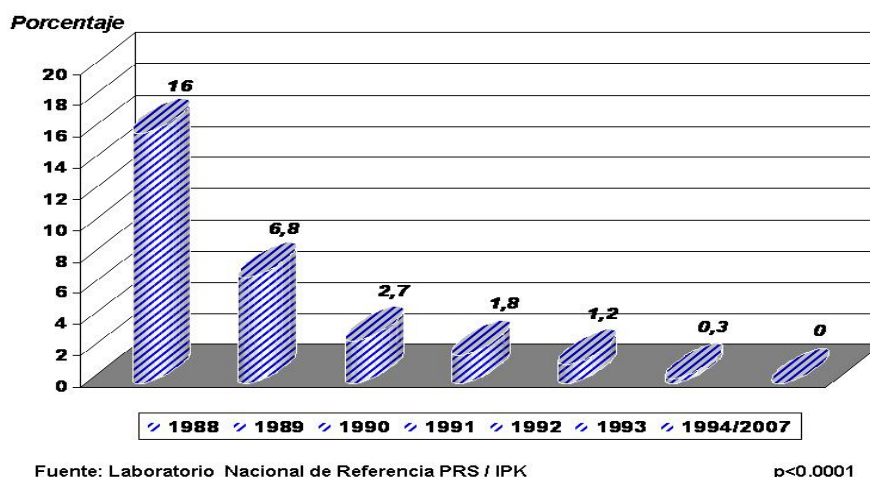


Figura 7. Porcentaje de casos positivos a sarampión, confirmados por el laboratorio. Cuba 1988/2007.

El diagnóstico serológico aplicado en la vigilancia, permitió monitorear la disminución del número de casos positivos al virus del sarampión en Cuba, después de implementada la vacunación en la población infantil al cumplir un año de edad, ya que se mantuvo una vigilancia estrecha y no se encontraron casos positivos en un periodo mayor de 10 años.

Se plantean varios factores que propiciaron la eliminación del sarampión en Cuba, dentro de los que se encuentra la estrategia de vacunación realizada, el tamaño reducido del territorio, la organización del sistema de atención primaria y la implementación del sistema de vigilancia epidemiológica y de laboratorio, lo que facilitó la detección y el control oportuno de cualquier importación de casos desde zonas endémicas y una posible transmisión viral en el país (MINSAP^a, 1999).

En la Tabla 4, se muestra la variación de la positividad al virus del sarampión por grupo de edad de los pacientes estudiados. El número mayor de casos positivos se encontró en el grupo de 1 a 5 años de edad (43/73; 58,9%), fundamentalmente en los años 90 (11/17; 64,7%), 91(15/22; 68,2%) y 92 (10/12; 83,3%). Los dos casos últimos de la enfermedad reportados en el país en el año 1993, se encontraron en el grupo anteriormente mencionado y en el de menos de un año (p<0,0001).

Tabla 4. Número de casos de sarampión confirmados por el laboratorio, según grupo de edad.
Cuba 1988/2007.

Edad	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	0/7	Total (%)
< 1	2	3	5	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	15(20,5)
1-5	3	3	11	15	10	1	0	0	0	0	0	0	0	43(58,9)
6-10	1	2	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	8(10,9)
11-15	1	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5(6,8)
16-19	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2(2,7)
20 y+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	8	12	17	22	12	2	0	0	0	0	0	0	0	73

Fuente: Laboratorio de Referencia PRS / IPK

p<0,0001

Desde el año 1988 a 1993, se produjeron brotes de sarampión en los niños en edad preescolar aunque la cobertura vacunal que se alcanzó fue de un 95%. Se planteó, que de 2 a 4 años después de recibirse la primera dosis de la vacuna triple viral, un número significativo de niños tiene los niveles de anticuerpos por debajo del nivel de protección y algunos permanecen desprotegidos, dando lugar a la aparición de casos de sarampión, recomendándose la realización de campañas de seguimiento cada 4 años, entre uno y cuatro años de edad (Pebody y cols, 2002; De Quadros y cols, 2004).

En Cuba, en los años 1994 y en el 2002, se realizaron campañas de vacunación contra el sarampión en niños hasta 4 años y a los 9 años respectivamente, que junto a la vacunación rutinaria al año de edad, permitió que la inmunidad alcanzada en la población infantil evitara la aparición de nuevos casos positivos en el país (MINSAP^a, 1999).

En el estudio realizado, se obtuvieron resultados similares a los alcanzados por Barhi y colaboradores en Tunes, quienes reportaron que después de lograr una cobertura de vacunación de un 90% en los primeros años posteriores a la introducción de la vacuna, se produjeron brotes de sarampión en niños menores de 4 años, decidiendo aplicar una dosis de refuerzo a los que se encontraban entre 1 a 4 años de edad, quedando protegidos aquellos que presentaron un fallo vacunal primario o secundario, mientras que otros autores consideraron que la segunda dosis debía aplicarse en las escuelas primarias, para de esta forma aumentar el nivel de anticuerpos en los adolescentes y adultos jóvenes (Johnson y cols, 1995; Barhi y cols, 2003; Lee y cols, 2005).

IV.3.2. Vigilancia de laboratorio a la rubeola. Cuba 1988/2007.

Durante el periodo estudiado, se les realizó detección de anticuerpos al virus de la rubeola a 15 462 muestras de suero recibidas en el laboratorio con un diagnóstico clínico de rubeola o sarampión, de las cuales 424 (2,7%) resultaron confirmadas como positivas.

Los años 1988 y 1989, fueron los que presentaron un porcentaje mayor de positividad con un 54% y 94% respectivamente. A partir de este momento, se produjo una disminución en el número de positivos hasta 1995, cuando se reportaron 3 (2,05%) casos. Desde 1996 a 2003, no se confirmaron muestras mediante diagnóstico de laboratorio, hasta que reaparecen nuevamente en 2004 con 19 (2,3%) casos de rubeola (Tabla 5) ($p < 0,0001$).

Tabla 5. Casos positivos al virus de la rubeola confirmados por el laboratorio. Cuba 1988-2007.

<i>Años</i>	<i>Muestras</i>	<i>Positivos</i>	<i>Por ciento</i>
1988	302	163	54,0
1989	187	175	94,0
1990	630	25	4,0
1991	1215	25	2,05
1992	1007	4	0,39
1993	595	8	1,34
1994	324	4	1,23
1995	146	3	2,05
1996	132	0	0,0
1997	327	0	0,0
1998	701	0	0,0
1999	1122	0	0,0
2000	1814	0	0,0
2001	1087	0	0,0
2002	900	0	0,0
2003	1068	0	0,0
2004	822	17	2,3
2005	1275	0	0
2006	1138	0	0
2007	670	0	0
Total	15462	424	2,7

Fuente: Laboratorio Nacional de Referencia PRS/IPK

$p < 0,0001$

Al igual que lo sucedido con el sarampión, la estrategia de vacunación aplicada en el país contra la rubeola, la introducción de la vacunación con la triple viral y el aumento de la cobertura de vacunación, permitieron el control de la infección con este virus y la desaparición de los picos epidémicos cada siete años (MINSAP^a, 1999).

En Cuba en el año 1989 y en el 2004, se produjeron brotes de rubeola en adultos jóvenes, supuestamente vacunados con una sola dosis hacia más de 10 años, lo cual se consideró ocasionado por la pérdida en el nivel de los anticuerpos contra el virus. Se señala, que el nivel de anticuerpos séricos alcanzado después de la vacunación permanece de por vida, sin embargo, aquellos inducidos por una sola dosis están presentes solamente un periodo de aproximadamente 20 años, sólo en aquellos lugares donde se producen contactos frecuentes con el virus y la enfermedad continúa siendo endémica o existe una circulación silenciosa del agente infeccioso, el nivel de anticuerpos permanece elevado (Davidkina y cols, 2000; Irons y cols, 2000; Prevots y cols, 2003; Quiroga y cols, 2003; Rota y Bellini, 2003; Venczel y cols, 2003).

En la Figura 8, se observa la distribución de los casos positivos al virus de la rubeola confirmados por el laboratorio en los diferentes grupos de edades estudiados, desde el año 1988 hasta el 2004. En 1988, se encontraron 42 casos positivos (163/26%) en los menores de un año, seguidos por los de 1 a 5 años con 36 (163/22%) y en los de 6 a 10 años con 32 (163/20%). En 1989 fue mayor en el grupo de 16 a 19 años (40/175; 23%) y más de 20 años (94/175; 54%).

En el periodo entre 1990 a 1995, los casos positivos disminuyeron en todos los grupos de edades, confirmándose en este último año tres casos de la enfermedad, los cuales se encontraban entre 1 y 5 años. Posteriormente, después de un periodo de 8 años sin reporte de casos de rubeola, se produjo un brote en 2004, en una población de adolescentes y adultos jóvenes entre 16 y 19 años (2/19; 10,5%) y 20 y más años de edad (17/19; 73,6%).

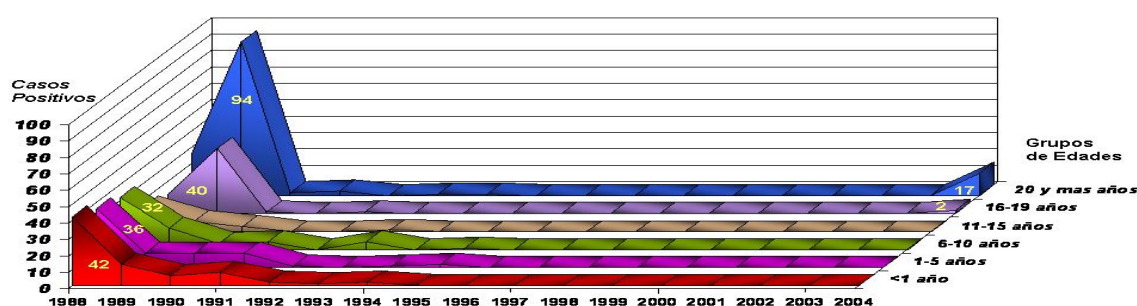


Figura 8: Distribución por edad de los casos positivos de rubeola confirmados por el laboratorio.
Cuba 1988/2004.

En los primeros años que siguieron a la vacunación, a pesar de que disminuyó el número de casos positivos al virus de la rubeola en el país, aún se produjeron brotes de esta enfermedad, sobre todo en niños menores de 10 años, observándose posteriormente un desplazamiento en la edad de aparición hacia los adultos jóvenes. Diferentes autores plantearon que la causa de este desplazamiento, es la disminución en los niveles de anticuerpos después de varios años de aplicada la vacuna triple viral (Barhi y cols, 2003; Lanzieri y cols, 2003; Sanz y de Ory, 2006).

Davidkina y colaboradores en 2000, confirmaron este planteamiento al realizar un estudio donde determinaron el nivel de anticuerpos al virus en adolescentes que arribaron a la edad de 15 años y que fueron vacunados cuando tenían entre 15 y 18 meses, observando una disminución considerable en el nivel de los mismos, lo que los exponía a la infección al ponerse en contacto nuevamente con el virus, recomendando la aplicación de una dosis de refuerzo a la edad de 12 años o incorporar al programa de inmunizaciones su reactivación en los primeros años de edad escolar.

Se observó una pérdida de la inmunidad en los niños que respondían correctamente a la primera dosis de la vacuna y que una segunda dosis corregía los fallos que se producían después de aplicada la primera, por lo que algunos países, dentro de ellos Suecia y Finlandia, decidieron realizar una estrategia de dos dosis de vacunación contra la rubeola y a partir de este momento, dejaron de reportar casos de esta enfermedad y de SRC (Peltola y cols, 1994; Kaneko y cols, 2006).

IV.3.3. Vigilancia de laboratorio a la parotiditis. Cuba 1988/2007.

Desde 1988 hasta 2007, se estudiaron en el laboratorio por la técnica IH 18 382 muestras de sueros pareados de pacientes con un diagnóstico de infección con el virus de la parotiditis, siendo confirmadas 1 566 para un 8,5% de positividad.

En la Figura 9, se muestran los casos positivos diagnosticados por el laboratorio desde 1997 al 2007. Como se puede observar en estos 10 años, el número de casos confirmados pasó de un 1,7% en 1997 a un 23 % en el 2007, encontrándose un 12,3%, 22,5% y 23% de positividad entre los años 2005, 2006 y 2007 respectivamente, siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,0001$). Sólo en el año 2001 no se encontraron casos positivos, aunque se recibieron en la vigilancia muestras de suero de personas con el diagnóstico de parotiditis.

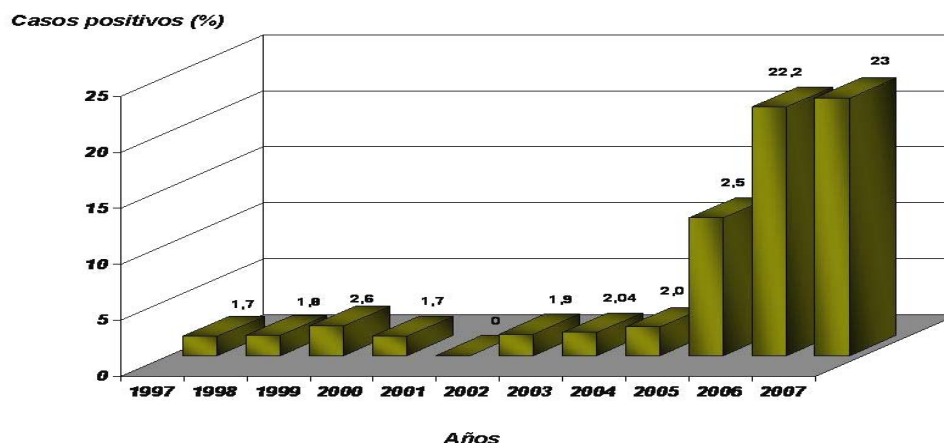


Figura 9. Porcentaje de casos positivos al virus de la parotiditis, confirmados por el laboratorio (1997/2007).

Desde la introducción de la vacunación contra la parotiditis, la incidencia de esta enfermedad disminuyó grandemente, pero al parecer no se detuvo la circulación del agente, dando lugar al mantenimiento de casos positivos diagnosticados por el laboratorio a través de los años. También la no sospecha de la enfermedad por parte del personal médico, condujo a subvalorar la incidencia real de la misma (De la Loma y cols, 2003).

La OMS reportó, que más de 121 países introdujeron en sus programas de inmunización la vacunación contra este virus, disminuyendo la circulación del mismo, mientras que en aquellos lugares donde no se aplicaba la vacuna, se seguían produciendo brotes que afectaban fundamentalmente a los niños entre 5 y 9 años de edad (OMS^d, 2008).

Al analizar los resultados obtenidos desde 1997 a 2007 en los diferentes grupos de edades estudiados (Figura 10), se puede observar que, desde 1997 a 2003, los casos positivos se encontraban en las edades entre 1 a 5 y de 6 a 10 años y a partir de 2004 se produjo un desplazamiento por encima de los 11 años, encontrándose en estos 10 años el mayor número de casos positivos entre los grupos de 11 a 15 (465/1 378; 33,7%), de 16 a 19 (420/1 378; 30,4%) y en 20 y más años (270/1 378; 19,5%).

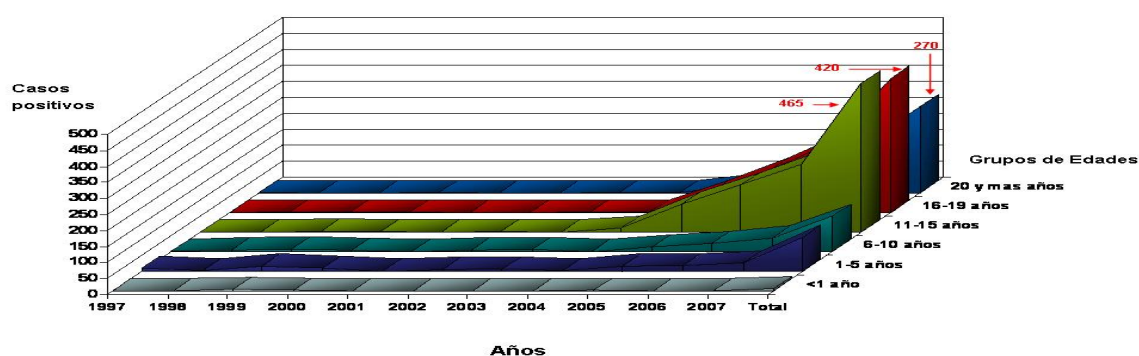


Figura 10. Casos positivos confirmados por el laboratorio al virus de la parotiditis, en los diferentes grupos de edades. 1997/2007.

Se considera que la circulación silente y la transmisión no reconocida del virus, contribuyeron a las dificultades en la identificación y contención de los casos en los niños en edad pre escolar y escolar y en adolescentes y adultos jóvenes, lo que cobró particular importancia a partir del año 2005. Se debe tener en cuenta que, cuando ocurre un brote en una población con alta cobertura de vacunación, existe una proporción de casos asintomático mayor de un 30%, las manifestaciones clínicas de la enfermedad tienden a ser atípicas y generalmente las pruebas de laboratorio resultan negativas (Barskey y cols, 2009).

Diferentes autores plantearon varios factores que también influyeron en el mantenimiento de la infección por el virus de la parotiditis en la población, dentro de ellos la circulación simultánea de diferentes genotipos, ya que se considera, que los anticuerpos neutralizantes desarrollados frente a los incluidos en las cepas vacunales, no protegen necesariamente contra uno distinto (De la Loma y cols, 2003; Muhlemann, 2004; De Ory y cols, 2007).

Una situación similar a la encontrada en Cuba, fue reportada en Estados Unidos, España, Austria y otros países, en los cuales la vacunación sistemática consiguió disminuir marcadamente la incidencia de la parotiditis en todas las edades, sin embargo, hubo una alta probabilidad de reinfecciones a pesar de las altas coberturas, ya que la inmunidad inducida por la vacuna es baja

debido a la poca efectividad de la cepa empleada en la misma (Schmid y cols, 2008; Barskey y cols, 2009; Castilla^a y cols, 2009).

También se planteó como otro factor importante, la pérdida de la inmunidad debido al tiempo transcurrido desde la aplicación de la vacuna contra la parotiditis en estos individuos, por lo que diferentes países decidieron vacunar nuevamente con la triple viral entre los 9 y 14 años de edad, sin embargo, se observaron brotes aún después de aplicada la misma (Kaaijk y cols, 2008).

IV.4. Estudio de seroprevalencia de anticuerpos a los virus del sarampión, rubeola y parotiditis en una población cubana entre 7 meses a 23 años de edad. Cuba 1999.

Para determinar la prevalencia de los anticuerpos a PRS, se estudiaron a través de la técnica IH 1 593 muestras de suero pertenecientes a individuos entre 7 meses y 23 años, los cuales tenían anticuerpos contra sarampión en un 86,8% (1 382/1 593), un 64,7% a rubeola (1 031/1 593) y un 86% (1 370/1 593) a parotiditis (Tabla 6).

Tabla 6. Prevalencia de anticuerpos a los virus del sarampión, la rubeola y la parotiditis en las muestras estudiadas. Cuba 1999.

Virus	Muestras	Positivas	Porcentaje	Intervalo de confianza (IC 95%)
Sarampión	1 593	1 382	86,8	85 – 88,3
Rubeola	1 593	1 031	64,7	62,3 – 67
Parotiditis	1 593	1 370	86,0	84,2 – 87,6

Fuente: Laboratorio Nacional de Referencia PRS / IPK

La prevalencia de anticuerpos encontrada contra estos virus no fue alta, lo que pudo ser ocasionada por varios factores, dentro de ellos la pérdida de la inmunidad con el paso del tiempo. Kremer y colaboradores en el 2006, después de estudiar 224 niños entre 6 a 8 años, a los cuales se les aplicó una sola dosis de la vacuna triple viral, encontraron que el nivel de anticuerpos al virus de la rubeola se reducía anualmente en un 2,9% y en un 1,6% en el caso del sarampión y la parotiditis.

Diferentes autores consideran, que la disminución de los anticuerpos después de varios años de aplicada la vacuna, no implica pérdida en la inmunidad, debido a la presencia de factores celulares y humorales relacionados con la protección dada por la vacunación, los cuales al parecer intervinieron en poblaciones donde no se detectaron anticuerpos y que no enfermaron al ponerse en

contacto con el virus. Dentro de estos factores están la ADCC (Actividad Citotóxica Celular Dependiente de Anticuerpos, siglas del inglés, Antibody Dependent Cell Cytotoxicity) , así como los linfocitos T citotóxicos, que evitan que estas personas enfermen nuevamente o en el caso de que se produzca la infección, la misma curse de forma leve o asintomático (Forthal y cols, 1994; Colomar y cols, 2003).

También la técnica seleccionada para realizar el estudio serológico, pudo mostrar una positividad inferior a la que realmente presentaba la población cubana en ese momento, sin embargo, en trabajos realizados por Mendelson y colaboradores en 1996 y Cox y colaboradores en 1998, donde emplearon la IH para determinar la presencia de anticuerpos en personas antes y después de ser vacunadas con la triple viral, expresaron que la misma se usa ampliamente para realizar este tipo de estudios y que tiene una buena correlación con el ELISA y la técnica de neutralización, reflejando el nivel real de anticuerpos de la población.

Una seroprevalencia al virus del sarampión similar a la encontrada en el estudio, fue reportada por Wong – Chew y colaboradores en México, quienes detectaron un 85% de anticuerpos, después de mantener la vacunación contra este virus por tres décadas (Wong – Chew y cols, 2003).

En Israel en el año 2006, se encontró un 66,7% de positividad al virus de la rubeola, después de aplicar una sola dosis de la vacuna al año de edad, aumentando por encima de un 80% después de la reactivación (Cohen y cols, 2006).

Pebody y colaboradores en 2002, hallaron una disminución significativa de los anticuerpos a sarampión y parotiditis cuatro años después de aplicarse una sola dosis de la vacuna, no así en el caso de la rubeola, planteando que esta baja proporción pudo deberse a factores tales como la edad de vacunación, fallos vacunales dados por pérdida de la potencia de la vacuna o a factores individuales.

La Tabla 7 muestra el nivel de anticuerpos alcanzado contra el virus del sarampión según grupo de edad, en las muestras estudiadas. A partir del año de edad, la prevalencia fue mayor del 80%, encontrándose el porcentaje más elevado en los niños de 2 a 5 años (91,5%), el cual resultó significativamente superior al resto de los grupos, para después disminuir en las edades de 6 a 10 años, 11-15 y 16-23 años ($p < 0,0001$).

Tabla 7. Prevalencia de anticuerpos al virus del sarampión según grupo de edad estudiado. Cuba 1999.

<i>Grupos de edades</i>	<i>Muestras Positivas</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Intervalo de confianza (IC 95%)</i>
1 año	122/158	7,2%	70 – 83
1 año	209/250	83,6%	78,4 – 87,7
2 - 5 años	464/507	91,5%	88,7- 93,6
6 - 10 años	133/153	87,0%	80,6 -91,4
11 - 15 años	195/223	87,4%	82,4 – 91,2
16 - 23 años	259/302	86,0%	81,3 – 89,2

Fuente: Laboratorio Nacional de Referencia PRS / IPK

p<0,0001

Al realizar el estudio en estos grupos de edades en el caso del virus de la rubeola, (Tabla 8), se observó que la prevalencia de anticuerpos fue también menor en los menores de 1 año (34,2%) que en el resto de los grupos, para aumentar hasta un 72% en los de 1 y en un 71% en los de 2 a 5 años, disminuyendo en los de 6 a 10 hasta un 50,3%, aumentando nuevamente a un 63,2% y un 73% en los de 11 a 15 y 16 a 23 años respectivamente. La diferencia fue significativa ($p < 0,0001$).

Tabla 8. Prevalencia de anticuerpos al virus de la rubeola por grupo de edad. Cuba 1999

<i>Grupos de edades</i>	<i>Muestras Positivas</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Intervalo de confianza (IC 95%)</i>
1 año	54/158	34,2	27,2 – 41,8
1 año	180/250	72,0	66,1- 77,2
2 - 5 años	360/507	71,0	66,9 – 74,7
6 - 10 años	77/153	50,3	42,4 – 58,1
11 - 15 años	141/223	63,2	56,7 – 69,2
16 - 23 años	219/302	73,0	67,2 – 77,2

Fuente: Laboratorio Nacional de Referencia PRS / IPK

p< 0,0001

El porcentaje de anticuerpos a los virus del sarampión y la rubeola encontrados, fue más bajo en los menores de un año que en el resto de los grupos estudiados, ya que sólo contaban con los obtenidos a través de la placenta, mientras que, entre 1 y 5 años de edad, se produjo un incremento debido a que la vacuna normalmente se aplica en el transcurso del segundo año de vida (entre los 12 a 18

meses) y los anticuerpos alcanzan su nivel mas alto en los primeros 5 años (Paunio y cols, 2000; Lee y cols, 2001).

También se observó una disminución en la prevalencia de anticuerpos a la rubeola entre los 6 y 10 años, lo que pudo ser causado por la caída de los mismos años después de aplicada la vacuna, sobre todo, en aquellos lugares donde se emplea una sola dosis de la misma (Chiu y cols, 1997).

En el caso particular de la rubeola, se observó un aumento en la seropositividad (73%) en el grupo de 16 a 23 años, se planteó que por la edad, estas personas debieron formar parte de la tercera estrategia de vacunación realizada en Cuba entre los años 1986 y 1987, la cual estuvo encaminada a la eliminación a corto plazo de la rubeola como enfermedad y el SRC, siendo vacunada con la triple viral toda la población desde 1 a 14 años, independientemente de estar inmunizados o padecer la infección natural con anterioridad (MINSAP^c, 1999).

Resultados similares a los encontrados en el estudio, fueron reportados por Gilbert y colaboradores en Australia, donde después de aplicar una dosis de vacuna, encontraron una positividad al virus del sarampión de un 70% en los de un año y entre un 80 y 89% en los que se encontraban entre 2 y 18 años, mientras que en el caso de la rubeola, se produjo un aumento de un 90% en los de 2 a 5 años, disminuyendo en los de 6 a 11 hasta un 79%, para después aumentar a un 85% en los de 11 a 18 años, planteando que este aumento a partir de los 11 años se debió a la estrategia con dos dosis llevada a cabo en su país entre los años 1971 a 1993 en las mujeres en edad fértil con el objetivo de prevenir el SRC (Gilbert y cols, 2001).

En el estudio realizado por Sultana y colaboradores en Bangladesh, encontraron una disminución significativa en el porcentaje de anticuerpos a rubeola en niños entre 5 meses y 9 años de edad, siendo la seroprevalencia de un 71% en las edades entre los 10 y 15 años. Este autor consideró que después de la aplicación de una sola dosis de la vacuna, quedaban niños menores de 10 años susceptibles de padecer la infección, recomendando la implementación de una segunda dosis a la edad de seis años (Sultana y cols, 2006).

Rodríguez y colaboradores en Medellín, Colombia, realizaron un estudio en niños entre 1 y 14 años, encontraron que la prevalencia de anticuerpos a sarampión tendía a subir en el segundo año de vida para después disminuir hacia los siete años, donde uno de cada tres niños tenía anticuerpos, debido a que recibieron una sola dosis de la vacuna, al porcentaje de cobertura vacunal alcanzado y a la edad en que se aplicó la misma (Rodríguez y cols, 1999).

Contrariamente a lo observado con el sarampión y la rubeola, la prevalencia de anticuerpos al virus de la parotiditis alcanzó su valor más alto en el grupo de 6 a 10 años con un 91,5% (140/153),

seguidos por los niños de un año con un 88,8% (222/250) y los de 16 a 23 (262/302; 86,7%). Los porcentajes menores se hallaron en los niños menores de 1 año, de 2 a 5 y de 11 a 15 años con un 84,1%, 83,6% y 84,7% respectivamente ($p < 0,0001$) (Tabla 9).

Tabla 9. Prevalencia de anticuerpos al virus de la parotiditis en los diferentes grupos de edades.
Cuba 1999.

<i>Edad</i>	<i>Muestras positivas</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Intervalo de Confianza (IC 95%)</i>
< 1 año	133/158	84,1	77,6 – 89,1
1 año	222/250	88,8	84,2 – 92,1
2 - 5 años	424/507	83,6	80,1 – 86,6
6 - 10 años	140/153	91,5	85,9 – 95
11 - 15 años	189/223	84,7	79,4 – 88,9
Fuente: Laboratorio Nacional de Referencia PRS / IPK			$p < 0,0001$

En los niños de 6 a 10 años, se encontró el mayor porcentaje de positividad a parotiditis, lo que pudo deberse al mantenimiento de la circulación del virus, dando lugar a infecciones leves o asintomáticas en la población.

Resultados similares se obtuvieron en Bangladesh en 2006, donde encontraron que los anticuerpos al virus de la parotiditis comenzaron a elevarse a partir de los 2 años de edad, alcanzando cifras de hasta un 90% en los adolescentes entre 14 y 15 años, se planteó como causa, a la exposición mantenida al virus salvaje (Sultana y cols, 2006).

En la Figura 11, se muestran los antecedentes de vacunación con la triple viral recogidos en las encuestas y la positividad a cada uno de los virus en los individuos estudiados. Del total de personas encuestadas, el 72% (1 152/1 593) expresaron estar vacunados, el 21% (332/1 593) reportaron que no lo fueron y el 7% (109/1 593) lo desconocían.

En aquellos que informaron estar vacunados, se encontraron anticuerpos contra el sarampión en un 87,2% y a rubeola en un 67,3%, en los no vacunados en un 84% y un 55,4% y en los que lo desconocían en un 91,7% y un 66%, la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$). En el caso de la parotiditis, en los encuestados que fueron vacunados, los no vacunados y los que lo desconocían, la positividad fue de un 86%, 84% y 91,7% respectivamente ($p > 0,005$).

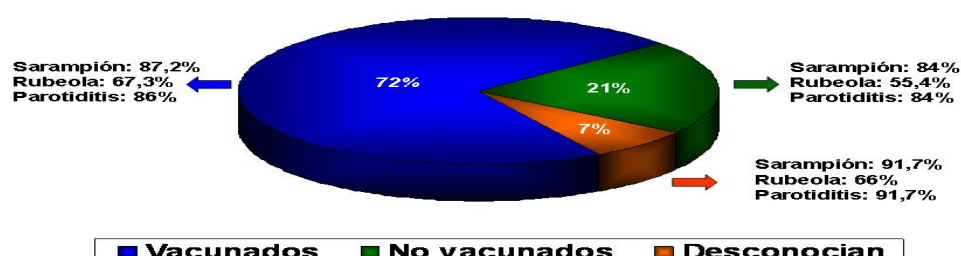


Figura 11. Antecedentes de vacunación con la triple viral recogidos en las encuestas y la positividad a cada virus en los individuos estudiados. Cuba 1999.

Los individuos que refirieron no estar vacunados, así como los que lo desconocían, presentaron anticuerpos a estas tres entidades, infiriéndose que fueron inmunizados previamente en las diferentes campañas realizadas en el país o padecieron la infección natural (MINSAP^a, 1999).

En el estudio realizado en México por Sepúlveda y colaboradores en 1992, encontraron un 62,4% de positivos a sarampión en individuos que refirieron no estar vacunados contra este virus, planteando que esto podía deberse al sesgo de memoria de los informantes, que pudieron considerar a una persona no vacunada cuando realmente lo estaba.

Al realizar la determinación de los TPG (Tabla 10), los menores correspondieron a los niños por debajo de 1 año de edad, siendo de 3,27 a sarampión, 9,46 a rubeola y 6,35 a parotiditis y los mayores a los que tenían un año (4,28 sarampión y 17,46 rubeola). En el caso de la parotiditis los títulos más altos de anticuerpos se hallaron en los grupos de 11 a 15 (7,68) y de 16 a 23 años (7,23) ($p > 0,001$).

Tabla 10. Títulos Promedios Geométricos encontrados en los diferentes grupos de edades estudiados. Cuba 1999.

<i>Edades</i>	<i>Sarampión</i> (IC 95%)	<i>Rubeola</i> (IC 95%)	<i>Parotiditis</i> (IC 95%)
< 1 año	3,27 (2,86;3,73)	9,46 (8,01;11,17)	6,35 (5,65; 7,13)
1 año	4,28 (3,83;4,8)	17,46 (15,4;19,8)	7,06 (6,46; 7,72)
2 - 5 años	3,64 (3,39;4,8)	15,9 (14,77;17,31)	6,85 (6,41; 7,31)
6 - 10 años	3,68 (3,25;4,17)	10,9 (9,43;12,00)	6,68 (6,06; 7,37)
11 - 15 años	3,44 (3,18;3,85)	12,77 (11,33;14,39)	7,68 (6,9; 8,56)
16 - 23 años	3,7 (3,36;4,07)	14,73 (11,62;14,02)	7,23 (6,65;7,86)

Fuente: Laboratorio Nacional de Referencia PRS / IPK

p<0,001

La causa de los TPG bajos encontrados en los niños antes del primer año, pudo deberse a la presencia los anticuerpos adquiridos pasivamente a través de la placenta. Se plantea que el predominio en las madres de los anticuerpos adquiridos por la vacunación, da lugar a los títulos bajos en los hijos recién nacidos, a diferencia del hallado si las mismas padecieran la infección natural con el virus (Mossong y cols, 2004; Sultana y cols, 2006).

Hacia el primer año de vida, los títulos de anticuerpos de las tres entidades comenzaron a aumentar, debido a la reciente administración de la vacuna, mientras que en adolescentes y adultos jóvenes, los valores de los TPG a parotiditis llegaron a ser más altos, asociados posiblemente al mantenimiento en la circulación del virus. Se plantea que cuando existen transmisiones subclínicas de la enfermedad, los títulos de los anticuerpos se incrementan en adolescentes y adultos jóvenes (Ito y cols, 2002).

La seroprevalencia encontrada en las tres entidades estudiadas, sobre todo en el grupo de 6 a 10 años, permitió recomendar a las autoridades de salud, la inclusión en el PNI de la reactivación con la triple viral a los 6 años de edad, ya que la eliminación del sarampión, la rubeola y la parotiditis, es posible con las vacunas existentes, pero una estrategia de vacunación aplicando una sola dosis no es suficiente para cumplir con este objetivo.

IV.5. Diagnóstico de un brote de rubeola. Cuba 2004.

La Tabla 11, muestra los resultados del estudio realizado a través de la técnica de ELISA/IgM al virus de la rubeola, a 111 monosueros pertenecientes a estudiantes extranjeros procedentes de Venezuela y

trabajadores cubanos sospechosos de estar infectados con este virus. El 57,6% (64/111) de las muestras fueron positivas, correspondiendo el mayor número (15/20; 75%) a las personas que se encontraban en las escuelas ubicadas en Ciudad de La Habana, seguido por las de Santiago de Cuba, donde la positividad alcanzó un 58,9% (43/73). En ambos planteles, los casos positivos fueron fundamentalmente estudiantes extranjeros con un 77,7% (14/18) y 87,09% (27/31) respectivamente.

Tabla 11. Casos ELISA/IgM positivos al virus de la rubeola en estudiantes extranjeros y trabajadores cubanos. Cuba 2004.

Grupos Estudiados	ETS C. Habana		ETS Stgo de Cuba		ETS Villa Clara		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Estudiantes extranjeros	14/18	77,7	27/31	87,09	6/18	33,3	47/67	70,1
Trabajadores cubanos	1/ 2	50	16/42	30,09	NE	----	17/44	38,6
Total	15/20	75	43/73	58,9	6/18	33,3	64/111	57,6

Fuente: LNR de PRS / IPK

*NE No estudiados

ETS. Escuela de Trabajadores Sociales

Al total de muestras de suero enviadas, también se les realizó detección de anticuerpos de tipo IgM al virus del sarampión que resultaron negativas y se colectaron muestras de exudados nasofaríngeos de 6 de los pacientes, para realizar aislamiento viral y TR-RCP, pero las mismas no fueron útiles debido a su inadecuada conservación y transportación al laboratorio.

Se plantea que uno de los principales retos a los que se enfrentan los países en vías de eliminación de la rubeola, es la importación desde áreas donde aun no se aplica la vacuna o la cobertura es baja (Tomer y cols. 2006).

En el estudio, el porcentaje mayor de muestras positivas encontrado correspondió a los estudiantes venezolanos, país donde se realizó una campaña de vacunación con la triple viral entre 1 y 4 años en 1998, a partir de esta fecha se incluyó en el PNI y se comenzó a aplicar a los niños al cumplir un año de edad, dando lugar a la reducción de la enfermedad en un 60%, pero la circulación del virus continuó en casi todos los grupos de edades (Betancourt, 2000; Valero y Maldonado, 2005).

En el año 2007, en Venezuela se realizó una nueva campaña de vacunación dirigida a la población entre 18 y 39 años de edad en ambos sexos, inmunizándose a más de 6,8 millones de personas en 3

semanas, pero la cobertura vacunal llegó a ser de sólo un 79% (<http://www.venezuelabolivariana.com/modules/news/article>).

La Tabla 12 muestra el número de casos positivos en los diferentes grupos de edades estudiados. En los estudiantes extranjeros la positividad fue mayor en los que tenían entre 30 y 39 años (1/1; 100%), seguidos por los de 15 a 19 años (16/19; 84,2%); mientras que en los trabajadores cubanos el mayor porcentaje correspondió al grupo entre 15 y 19 (2/2; 100%) y en los que se encontraban entre 30 a 39 fue de un 41,1% (7/17).

Tabla 12. Casos positivos al virus de la rubeola, en los diferentes grupos de edades estudiados. Cuba 2004.

Grupos de edades	Estudiantes extranjeros	Trabajadores cubanos*
15 – 19 años	16/19 (84,2%)	2 / 2 (100%)
20 – 29 años	19/29 (65,5 %)	4/14 (28,6%)
30 – 39 años	1 / 1 (100 %)	7/17 (41,1 %)
40 y más	0 / 1	2/8 (22,2 %)
No Edad	11/17*(64,7%)	2/3(66,6%)*
Total	47/67	17/44

Fuente: Laboratorio Nacional de Referencia PRS/IPK

*No se conoció la edad.

En la Tabla 13 se relaciona la positividad al virus de la rubeola y el sexo de las personas infectadas. Al sexo femenino correspondió el 31,9% (15/47) de positividad en los estudiantes venezolanos y el 70,6% (12/17) en los trabajadores cubanos. En cuanto al sexo masculino, el 68% (32/47) de los estudiantes y el 29,4% (5/17) de los trabajadores fueron positivos. La diferencia de positividad fue significativa ($p < 0,001$).

Tabla 13. Positividad al virus de la rubeola según el sexo. Cuba 2004.

Sexo	Estudiantes extranjeros	Trabajadores cubanos
Femenino	15/47 (31,9%)	12/17 (70,6%)
Masculino	32/47 (68%)	5/17 (29,4%)

Fuente: Laboratorio Nacional de Referencia PRS / IPK.

Al realizar el análisis de los resultados encontrados en las tablas anteriores, se consideró que la causa del 100% de positividad entre los trabajadores entre 15 y 19 años y los estudiantes entre 30 y 39 años, fue el número pequeño de muestras analizadas.

El porcentaje de positivos en el grupo de 30 a 39 años y en el sexo femenino encontrado en los trabajadores cubanos, pudo estar relacionado al predominio de esta edad y sexo en las personas que laboraban en la escuela, aunque no debe descartarse la posibilidad de la presencia de un fallo vacunal primario o secundario, debido al tiempo transcurrido de la vacunación inicial contra la rubeola.

Se plantea que los brotes de rubeola en adultos, son de especial preocupación sobre todo en la mujer en edad reproductiva, considerándose que la estrategia de inmunización en los primeros años de vida no es suficiente para prevenir la enfermedad y se debe tener en consideración la vacunación en el adulto sobre todo del sexo masculino, ya que en múltiples ocasiones son los hombres los que transmiten la infección a las mujeres (Poland y Jacobson, 1994).

Ejemplo de ello es el estudio realizado por Kaneko y colaboradores en Japón, donde estudiaron 12 embarazadas después de un brote de rubeola, encontrando que 3 de ellas se habían enfermado al ser contagiadas por los esposos infectados con este virus (Kaneko y cols, 2006).

La OMS reportó que entre los años 1998 a 2006, se produjo una disminución del 98% de la rubeola en los países de América Latina debido a la vacunación, pero hubo un aumento en el número de positivos en 2007, debido a brotes ocurridos en varios países tales como Argentina (96 casos), Brasil (8 683 casos) y Chile (4 235 casos), sobre todo en el sexo masculino, en aquellos lugares donde inicialmente se vacunó a la población femenina solamente (Irons y cols, 2000; Lanzieri y cols, 2003; OMS ^c, 2008).

En Cuba se implementaron las medidas orientadas por la OMS para evitar la transmisión de la rubeola, entre las cuales se encuentra, la incorporación en el programa de inmunizaciones la vacuna contra este virus y la aplicación de la misma a todos los niños al año de edad, el logro de coberturas por encima del 95%, la realización de campañas de inmunización en adolescentes y adultos jóvenes del sexo femenino y el establecimiento de una vigilancia integrada tanto epidemiológica como de laboratorio al sarampión y la rubeola/SRC, no obstante, se produjo el brote del 2004, lo que mostró la existencia en el país de una población adulta joven, susceptible de padecer la infección, con el peligro de reaparición del SRC (MINSAP ^c, 1999).

IV.6. Determinación de la avidez de los anticuerpos de tipo IgG en el suero de trabajadores cubanos involucrados en el brote de rubeola de 2004.

Debido a que 17 de los trabajadores cubanos de las ETS de Santiago de Cuba y Ciudad Habana, presentaron anticuerpos de tipo IgM anti rubeola en sus sueros, según se determinó con la técnica ELISA, inicialmente se consideró que los mismos habían sufrido una reinfección con el virus, ya que por la edad que presentaban, debieron ser inmunizados al año de edad, participar en alguna de las campañas de vacunación contra la rubeola llevadas a cabo en el país o padecer la infección natural, decidiéndose realizar el estudio del IAR de la IgG en sus muestras de suero.

Se encontró que en 12 (70,6%) de los casos, no se pudo determinar el valor del IAR por ser la DO inferior a 0,15, en 3 (17,6%) el IAR fue bajo y en 2 (11,7%) fue alto, planteándose que 15 (88,2%) de estos trabajadores presentaron una infección primaria y sólo dos de ellos secundaria (casos 12 y 14) (Tabla 14).

Tabla 14. Estudio del IAR en las primeras muestras de los casos infectados con el virus de la rubeola.

Casos	ELISA/IgM	IAR	Clasificación
1	Pos	ND	Primaria
2	Pos	ND	Primaria
3	Pos	ND	Primaria
4	Pos	ND	Primaria
5	Pos	ND	Primaria
6	Pos	ND	Primaria
7	Pos	ND	Primaria
8	Pos	ND	Primaria
9	Pos	ND	Primaria
10	Pos	ND	Primaria
11	Pos	Baja Avidez	Primaria
12	Pos	Alta avidez	Secundaria
13	Pos	Baja Avidez	Primaria
14	Pos	Alta Avidez	Secundaria
15	Pos	ND	Primaria
16	Pos	ND	Primaria
17	Pos	ND	Primaria

Fuente: Laboratorio Nacional de Referencia PRS / IPK

ND: No determinado (DO < 0,15)

La infección primaria presente en las personas estudiadas, nos indica que las mismas o no sufrieron la infección natural, no fueron vacunadas o tuvieron un fallo vacunal primario, por lo que los valores del IAR no pudieron ser determinados o fueron bajos.

Se plantea que una vez que los anticuerpos son producidos, las células B permanecen circulando siendo responsables de la respuesta de memoria ante una nueva exposición a ese mismo antígeno y esta respuesta está dada por un incremento en el IAR de la IgG, siendo esta prueba muy útil para diferenciar la infección primaria, de la presencia de una infección secundaria (Fox y cols, 2006).

En los casos 12 y 14 (Tabla 14), que presentaron una infección secundaria, se plantea que ya existía una exposición previa al virus, presentando una respuesta elevada de anticuerpos al ser analizado el IAR. Diferentes autores expresan que la evidencia de este tipo de infección es aceptada en aquellas personas que tienen anticuerpos de memoria, los cuales aumentan significativamente ante una nueva exposición, lo que puede ir acompañado o no de una respuesta positiva de la IgM, la cual por lo general es débil, produciéndose picos muy reducidos de la misma, no captaándose por los sistemas serológicos habitualmente empleados (Bellini y Helfand, 2003; Mubareka y cols, 2007; Vauloup-Fellous y Grangeot-Keros, 2007).

Transcurridos varios días del estudio de los 17 primeros sueros de los casos infectados con el virus de la rubeola, se colectaron las segundas muestras de 15 de estos individuos, con el objetivo de conocer si se mantenía la presencia de los anticuerpos de tipo IgM y las variaciones producidas en el IAR. A los sueros pareados, se les realizaron las técnicas de IH y el ELISA/IgG para la determinación del valor del IAR, obteniéndose los resultados que se observan en la Tabla 15.

Todas las segundas muestras resultaron positivas con el ELISA/IgM y con la técnica de IH, el 73,3% (11/15) presentó serconversión o aumento del título cuatro veces o más del segundo suero con respecto al primero. Los valores del IAR en las segundas muestras pasaron a ser altos, moderados y de baja avidez.

Tabla 15. Días transcurridos en la toma de las 15 segundas muestras y resultados del ELISA/IgM, IH e IAR.

Casos	Días	IgM	IH	IAR
1	24	pos	<10/80	alta avidez
2	40	pos	10/40	alta avidez
3	28	pos	10/80	moderado
4	13	pos	20/40	baja avidez
5	14	pos	40/40	baja avidez
6	23	pos	10/40	moderado
7	14	pos	<10/20	baja avidez
8	21	pos	10/40	alta avidez
9	17	pos	20/80	moderado
10	11	pos	40/80	moderado
11	12	pos	20/40	baja avidez
12	12	pos	10/40	alta avidez
13	39	pos	10/40	alta avidez
14	27	pos	20/320	alta avidez
15	22	pos	10/40	moderado

Fuente: Laboratorio Nacional de Referencia PRS / IPK

Se plantea, que los anticuerpos de tipo IgM pueden permanecer durante las 6 primeras semanas de la infección, incluso hasta 3 ó 12 meses después de comenzados los síntomas, observándose un aumento en el rango de detección en la fase convaleciente, por lo que el cálculo de la avidez de la IgG es muy importante para distinguir si se trata de una infección primaria o una reinfección, especialmente en las mujeres embarazadas (De Quadros y cols, 1996; Helfand y cols, 1997; Bellini y Helfand, 2003; Hamkar y cols, 2005; Vicari y cols, 2006).

Al realizar el análisis de las primeras y segundas muestras de suero con la técnica IH, se encontró seroconversión o aumento de título cuatro veces o más del segundo suero con respecto al primero, relacionándose este resultado, con la clasificación de infección primaria que se obtuvo a través de la detección del IAR.

También en los casos clasificados como infección secundaria (casos 12 y 14), hubo un aumento del título del segundo suero con respecto al primero en 4 diluciones o más con la técnica IH.

Se plantea, que una vez que se obtiene un porcentaje de avidez alto, el mismo no se modifica a lo largo de la vida del sujeto, independientemente de las oscilaciones que se produzcan en el nivel de los anticuerpos como consecuencia de reinfecciones o reactivaciones (Binley y cols, 1997; Paunio y cols, 2000).

la muestra y de inicio de los síntomas, la técnica empleada, la preparación del antígeno para el estudio, la concentración del reactivo que actúa como disociante e incluso el método para realizar el cálculo de los resultado (Narita y cols, 1998; Sirvent y cols, 2000; Gutiérrez y Maroto, 2004).

La detección de la avidez de la IgG mostró ser una técnica útil, no sólo en el diagnóstico de diferentes enfermedades donde se desea conocer si se produjo una infección primaria o secundaria, sino también, en aquellas donde las manifestaciones clínicas son poco específicas, no hay respuesta aparente de la IgM y se produce una aparición precoz de la IgG, sin seroconversión demostrable o cuando la IgM es positiva a uno o varios virus, por lo que se recomienda su inclusión en el laboratorio como complemento de la detección de la IgM, ante la posibilidad de que la positividad de este anticuerpo no se deba precisamente a una infección primaria, sino a una recurrencia clínica o a un estímulo policlonal inespecífico (Ratnam y cols, 2000; Bellini y Helfand, 2003; Gutiérrez y Maroto, 2004).

IV. 7. Diagnóstico de brotes de parotiditis. Cuba 2004/2007.

En los últimos años, en diferentes países del mundo que mantuvieron altos porcentajes de cobertura vacunal con la triple viral, se reportaron brotes de parotiditis en adolescentes y adultos jóvenes, muchos de los cuales eran estudiantes (Bloom y Wharton, 2005).

En Cuba se comenzó a observar a partir del año 2004, un incremento en el número de personas con esta enfermedad, recibándose en el laboratorio desde este año al 2007 un total de 6 937 muestras de sueros pareados con el diagnóstico clínico de parotiditis, las cuales fueron estudiadas con la técnica de IH, encontrándose que 1 284 (18,5%) eran positivas, pasando la positividad de un 2,5% en el 2004 a un 23% en el 2007(Tabla 16) ($p<0.05$).

Tabla 16. Casos positivos de parotiditis confirmados serológicamente por el laboratorio en el periodo 2004-2007.

<i>Años</i>	<i>No. de casos</i>	<i>Positivos (%)</i>
2004	589	15 (2,5)
2005	1654	203(12,3)
2006	1922	428(22,2)
2007	2772	638(23)
Total	6937	1284 (18,5)

Fuente: Laboratorio Nacional de Referencia PRS / IPK

$p<0,05$

Cuba experimentó en este periodo el número mayor de casos de parotiditis desde la introducción de la vacuna triple viral en 1986, similar a lo reportado en diferentes países como Inglaterra donde se produjeron más de 50 000 infectados con este virus entre 2004 y 2005, Estados Unidos con más de 25 000 en 2006 y España con más de 1 300 entre 2006 y 2007 entre otros, en muchos de los cuales las personas recibieron una sola dosis de la triple viral al año de edad y hasta dos dosis de esta vacuna (Savage y cols, 2005; Mac Donald y Flegel, 2007).

Se planteó que el aumento de la incidencia de la parotiditis a nivel mundial, estaba relacionado con la cepa empleada en la vacuna, la cual presenta un 80% de efectividad, quedando después de aplicada una sola dosis, un 20% de individuos vulnerables de padecer la enfermedad y un 5% después de recibir dos dosis (De la Loma y cols, 2003; Savage y cols, 2005; Gemmil, 2006; Mac Donald y Flegel 2007).

En un estudio realizado en España en 2007, se observó que después de implementada la vacunación, se produjo un significativo descenso en la incidencia de la parotiditis, no obstante se siguieron produciendo casos, asociándose el empleo de la cepa Rubini en la vacuna como causa de la baja seroprevalencia y por lo tanto de la reaparición de la enfermedad. Esta cepa fue sustituida por la Jeryl Lynn, la cual a pesar de su mayor inmunogenicidad, tampoco garantizó una protección total (De Ory y cols, 2007, Castilla^b y cols, 2009).

En Cuba se emplearon diferentes vacunas con distintas cepas del virus de la parotiditis, dentro de ellas la Leningrad- Zagreb y la Urabe AM9, siendo esta última la que se utiliza actualmente. Se reportó que esta cepa, a pesar de su eficacia e inmunogenicidad, es capaz de causar meningitis aséptica en algunas personas vacunadas, pero se plantea, que la vacunación produce una disminución considerable de esta complicación y si llega a producirse, la recuperación no deja secuelas, mientras tanto, después de la infección natural, la meningitis se produce en el 10% de los niños. Por las razones anteriores se sustituyó en muchos países, no obstante, continúa formando parte de la vacuna que se emplea en América Latina, debido a que su costo es inferior a la que contiene la cepa Jeryl Lynn o la Rubini (Fullerton y Reef, 2002; Valcarcel, 2007; Senanayake, 2008).

Otra causa del surgimiento de los brotes de parotiditis a nivel mundial, es la existencia de 13 genotipos del virus, que representan entre si una neutralización cruzada incompleta y sólo están representados en un pequeño número en las vacunas actuales. Estos genotipos en muchas ocasiones se encuentran distantes filogenéticamente de los que producen los brotes (Kaaijk y cols, 2008).

Como se puede observar en la Tabla 17, los primeros casos confirmados por el laboratorio a través de las técnicas serológicas, fueron diagnosticados en las provincias de Ciudad Habana (13/86,6%) y Guantánamo (2/13,3%) en 2004. En 2005, la enfermedad comenzó a extenderse al resto del país, encontrándose el número mayor de muestras positivas nuevamente en Ciudad Habana y Guantánamo (26/12,8%; 98/48,3%), incorporándose la Provincia de la Habana, con un 23,2% (47/203). En los años 2006 y 2007, ya en todas las provincias se habían confirmado casos de parotiditis, presentando Santiago de Cuba y Guantánamo en el 2006 un 18,7% (80/428) y un 18,9% (81/428) respectivamente y en 2007, se reporta a Villa Clara como una de las de mayor porcentaje con un 14,7% (94/638). En los cuatro años estudiados, se pudo observar que las provincias Ciudad Habana (180/ 14%), Villa Clara (106/ 8,3%), Santiago de Cuba (192/ 15%) y Guantánamo (187/ 14,5%), fueron las más afectadas por este evento epidemiológico.

Tabla 17. Casos de parotiditis confirmados serológicamente por el laboratorio en las diferentes provincias del país. Cuba 2004/2007.

Año	IJ	PR	PH	CH	MT	VC	CF	SS	CA	CM	TN	HG	GM	SC	GT	Total
2004	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	15
2005	0	2	47	26	1	3	0	2	15	1	1	3	0	4	98	203
2006	0	13	29	46	15	9	21	20	38	9	0	34	24	80	81	428
2007	7	57	9	95	65	94	14	28	11	53	0	34	43	108	6	638
Total	7	72	85	180	81	106	35	50	64	63	1	71	67	192	187	1284

Fuente: Laboratorio Nacional de Referencia PRS / IPK

En la Figura 13, se muestran los casos positivos confirmados serológicamente por el laboratorio por grupos de edades. La positividad fue aumentando con el transcurso de los años, siendo 2007 donde un número mayor se encontró, fundamentalmente en los grupos de 11 a 15 y 16 a 19 años de edad, con 148(34,5%) y 134(31%) en el 2006 y 213 (33,3%) y 217(34%) en 2007, en cada grupo respectivamente.

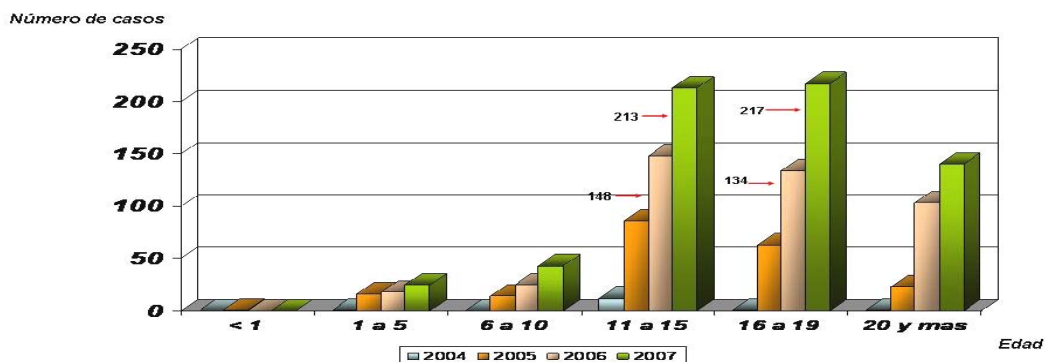


Figura 13. Casos positivos a parotiditis confirmados serológicamente por el laboratorio en los diferentes grupos de edades estudiados. Cuba 2004/2007.

Resultados similares se observaron en los Estados Unidos durante estos mismos años, donde la infección se extendió rápidamente por el país y en todos los grupos de edades, ocurriendo la mayoría de los casos en jóvenes entre 18 y 25 años, muchos de los cuales recibieron dos dosis de la vacuna. También en Canadá en el 2007, el 50% de los estudiantes de preuniversitarios y universitarios entre 20 y 29 años, se infectaron con el virus de la parotiditis (Gemmil 2006, Kancherla y Hanson, 2006, Peltola y cols, 2007).

En 10 (66,6%) de las muestras de orina colectadas en los 15 casos confirmados como positivos en 2004, se obtuvo aislamiento viral, siendo identificados los mismos con la técnica de TR-RCP, mientras que los exudados nasofaríngeos fueron negativos. Al analizar directamente las muestras con la TR-RCP, se encontraron 8 (53,3%) orinas positivas, mientras que los exudados nasofaríngeos se mantuvieron negativos (Tabla 18).

Tabla 18. Confirmación de los casos positivos a parotiditis. Cuba / 2004.

<i>Técnica empleada</i>	<i>Tipo de muestra</i>	<i>Positivas</i>	<i>Negativas</i>
<i>Aislamiento Viral</i>	Orina	10 (6,6%)	5 (33,3%)
<i>Aislamiento Viral</i>	Exudado Nasofaríngeo	0	0
<i>TR- RCP</i>	Aislamiento en orina	10 (66,6%)	5 (33,3)
<i>TR-RCP</i>	Orina	8 (53,3%)	7 (46,6%)
<i>TR-RCP</i>	Exudado Nasofaríngeo	0	0

Fuente: Laboratorio Nacional de Referencia PRS /IPK

Con el aislamiento viral y la TR-RCP en orina, se encontraron resultados similares a los obtenidos por De la Loma y colaboradores en el 2003 y Bitsko y colaboradores en el 2008, quienes plantearon la utilidad de las técnicas moleculares en el diagnóstico de la parotiditis por ser sensibles y específicas y constituir un sustituto fiable del aislamiento viral. Estos autores también hallaron una positividad baja con la técnica TR-RCP al estudiar 20 exudados nasofaríngeos, encontrando que sólo el 35% de estas muestras fueron positivas, recomendando que para obtener aislamiento y ARN positivo en los exudados, deben ser colectados en los tres primeros días de la FIS. Ortuondo y colaboradores en el 2007, también realizaron la TR-RCP en este tipo de muestras en los tres primeros días de la FIS, obteniendo una positividad de un 37% (de la Loma y cols, 2003; Bitsko y cols, 2008).

Se plantea que, diferentes causas dieron lugar a la epidemia de parotiditis en la población joven en diferentes países del mundo, dentro de ellas, la disminución en el nivel de los anticuerpos debido a que gran parte de estos individuos recibieron una sola dosis de la vacuna al año de edad, el estilo de vida de los jóvenes, los cuales realizan múltiples actividades sociales, la vía de transmisión respiratoria y la forma subclínica de la enfermedad, facilitando la diseminación e interfiriendo en su control. También se expresó que cualquier alteración en la cadena de frío pudo provocar cambios significativos en la potencia de la vacuna, con la consiguiente disminución en la respuesta inmune, así como la demora en su uso después de la reconstitución (más de 30 min) y la exposición a la luz, lo que ocasiona inactivación del virus (Kancherla y Hanson, 2006; Domínguez y cols, 2010).

Para el control de la parotiditis es necesario, mantener un alto nivel de inmunidad, haciéndose necesaria la aplicación de una segunda dosis de la vacuna con alguna de las cepas actuales, mantener altas coberturas y obtener una vacuna que confiera una inmunidad prolongada en la población (Peltola y cols, 2007).

V. CONSIDERACIONES GENERALES

En 1986, quedó establecido en Cuba el programa de eliminación del sarampión y se integró al mismo el de la rubeola/SRC y el de parotiditis. A partir de este momento, se incorporó la vacunación con la triple viral al PNI y se produjo una reducción significativa en la notificación de casos de estas enfermedades (MINSAP^b, 1999). También, junto a las investigaciones clínico - epidemiológicas, se incorporaron los estudios de laboratorio a la vigilancia, los cuales constituyeron un apoyo decisivo a la misma y aportaron la información esencial que permitió confirmar o descartar los casos probables y evaluar el impacto de las actividades desarrolladas en las campañas de vacunación.

A medida que el laboratorio introdujo nuevas técnicas y muestras para el diagnóstico, se desarrollaron diferentes algoritmos de trabajo, siendo los estudios serológicos los más ampliamente empleados, estableciéndose como técnica de rutina la determinación de anticuerpos de tipo IgM a través del ELISA al sarampión y la rubeola, con la ventaja de ser mas rápida, precisa, reproducible y eficiente, pero los casos positivos fueron confirmados inicialmente con la IH y posteriormente con el ELISA para detectar anticuerpos de tipo IgG.

La IH continúa siendo la prueba de oro en el diagnóstico y en este estudio se emplea para diagnosticar la parotiditis. Esta técnica sólo se realiza en laboratorios especializados y está considerada como un método que mide realmente la inmunidad (Vicari y cols, 2006).

Actualmente, el mayor desafío que afronta la vigilancia de laboratorio, es la presencia de casos esporádicos de resultados falsos positivos de la IgM, principalmente aquellos que son sospechosos sin antecedentes de viajes, con o sin el antecedente de vacunación y sin nexo epidemiológico, lo que hace necesario enviar de inmediato la información de los mismos a las autoridades de salud, para dar inicio a las investigaciones clínico - epidemiológicas y obtener una segunda muestra para la confirmación por parte del laboratorio (Vicari y cols, 2006).

Se plantea que la vigilancia virológica es la que proporciona la evidencia de interrupción de la transmisión endémica, incorporándose al algoritmo diagnóstico, las técnicas de aislamiento viral y

la detección de ácidos nucleicos, las cuales permiten, no sólo la confirmación serológica, sino también, el estudio de genotipos para definir la presencia de casos autóctonos o importados (Castillo^b y Ruiz, 2009). No obstante, a pesar de solicitarse por el laboratorio muestras adicionales (exudados nasofaríngeos y orina) para la detección viral, las mismas no son enviadas, a no ser en caso de brotes, debido a problemas relacionados con recogida, transporte, almacenamiento, además de la falta del conocimiento de la importancia que reviste para la vigilancia de estas enfermedades la obtención de las mismas, siendo necesaria una estrecha coordinación, designación de responsabilidades y capacitación, del personal de salud que participa en esta actividad (virólogos, epidemiólogos, médicos de asistencia).

La realización de la encuesta seroepidemiológica en la población de 7 meses a 23 años en 1999, permitió conocer la disminución en el porcentaje de anticuerpos a estas tres enfermedades en la población, varios años después de aplicada la vacuna. Las encuestas en la vigilancia sirven para evaluar el estado inmune de los individuos y los resultados de las intervenciones adoptadas en el programa (Sepúlveda y cols, 1992).

De especial interés fue el diagnóstico del brote de rubeola en adultos jóvenes en el 2004, debido a la importación del virus desde un país donde no se logró la eliminación de esta enfermedad, conociéndose de la existencia en Cuba de individuos susceptibles de ser infectados, a pesar de las campañas de vacunación realizadas. La determinación de la avidez de la IgG en estos casos, mostró que el mayor número de ellos presentó una infección primaria, ya que se plantea, que del 2 % al 5% de los niños vacunados a una edad apropiada y en condiciones óptimas, no seroconvierten en la primera dosis de la vacuna, entre otras causas que originan el fallo vacunal primario (Salleras y Alcalde, 2003).

Teniendo en cuenta estos resultados, se sugirió a las autoridades de salud, incorporar la segunda dosis de la vacuna triple viral al PNI, con el objetivo de mantener niveles de protección adecuados en la población de niños, adolescentes y adultos jóvenes, que junto a una alta cobertura vacunal y una vigilancia clínico - epidemiológica con el apoyo del laboratorio efectiva, permitirían mantener la eliminación de PRS en el país.

Entre el 2004 y el 2007, se notificaron en Cuba un número significativo de casos de parotiditis, en adolescentes y adultos jóvenes, similar a lo reportado en diferentes países del mundo (Valcarcel, 2007; Kaajik y cols, 2008).

Se plantea, que la vacunación contra la parotiditis confiere una inmunidad para toda la vida, sin embargo, muchos de los casos positivos recibieron una o dos dosis de la misma y otros fueron infectados naturalmente con el virus. Se estima, que aplicar una segunda dosis, aún con una alta cobertura de vacunación, no es suficiente para crear una inmunidad en la población que evite la aparición de nuevos brotes, ya que la inmunidad inducida por algunas cepas vacunales, pueden no ser efectivas frente a las cepa circulante, debido a cambios en los epitopes neutralizantes (Okafuji y cols, 2006; Domínguez y cols, 2010).

En Cuba, la confirmación de los casos de parotiditis condujo a que las autoridades de salud tomaran la decisión de vacunar con la triple viral a los jóvenes entre 12 y 24 años, mediante la realización de una Campaña Nacional de Vacunación en 2006 (Valvarcel, 2007).

Unido a la incorporación de técnicas cada vez más sensibles y específicas en el diagnóstico, fue necesario incrementar la calidad del mismo, para ello se participa en el programa mundial de evaluación de la competencia en materia de pruebas sexológicas, donde los resultados son satisfactorios, siendo acreditado por parte de la OPS/OMS, por su eficacia y desempeño en la red de laboratorios que apoyan el programa de inmunización de Las Américas.

Para mantener los resultados alcanzados en el programa de eliminación de PRS en Cuba, es necesaria una vigilancia epidemiológica y de laboratorio de alta calidad, que permita captar casos importados o relacionados a la importación, fortalecer la vigilancia virológica, capacitar al personal de laboratorio en la red en cuanto a recolección, transporte y almacenamiento de las muestras y realizar estudios de seroprevalencia (Vicari y cols, 2007; Castillo^a y Ruiz 2009).

Después de todos los esfuerzos y logros obtenidos en la vigilancia de PRS, existe la interrogante de si el sarampión, la rubeola/SRC y la parotiditis llegarán a ser eliminados o erradicados a nivel mundial. Se conoce, que estas enfermedades disponen de vacunas de alta eficacia, existe un sólo serotipo del virus, el humano es el único reservorio y no cuentan con portadores crónicos. Sin embargo, a pesar de los logros en los programa de eliminación, en el año 2010 se notificaron brotes de sarampión en Canadá (31 casos) y Estados Unidos (14), como resultado de las importaciones y en septiembre de 2009 se confirmó el último caso autóctono de rubeola en Brasil, además continúan produciéndose los brotes de parotiditis (Castillo^a y Ruiz , 2009).

La probabilidad de eliminación es factible y práctica, pero debe existir una vigilancia epidemiológica y de laboratorio constante para impedir el restablecimiento de la transmisión del agente, mantener una alta cobertura vacunal (mayor de un 95%), verificar la ausencia de las cepas

endémicas del virus y lograr la sostenibilidad de los PNI (Castillo^b y Ruiz, 2009; Orestein, 2010), ya que, para la erradicación, aún se necesitan grandes esfuerzos, porque la rubeola y la parotiditis no forman parte aún de los programas de eliminación de muchos países y el sarampión continúa siendo una importante causa de morbilidad en la población infantil, es altamente infecciosa, necesita de una inmunidad entre el 93 y el 95%, existe un alto crecimiento poblacional a nivel mundial, las migraciones y los viajes internacionales llevan a una fácil y rápida diseminación de la enfermedad, además de la presencia de poblaciones con baja respuesta inmunológica (infectados con VIH), la vacuna no es efectiva en los niños muy pequeños, se necesitan dos dosis para mantener una protección adecuada y sobre todo, la necesidad de una voluntad política (Castillo^b y Ruiz, 2009; Plotkin, 2010).

VI. CONCLUSIONES

1. La evolución y perfeccionamiento científico del sistema de vigilancia de laboratorio de sarampión, rubéola y parotiditis, contribuyeron al desarrollo del programa de inmunizaciones del país.
2. Se demostró que la incorporación de la vigilancia de laboratorio al programa de eliminación de PRS, es imprescindible en la confirmación de los casos diagnosticados por criterios clínicos y epidemiológicos.
3. Se confirmó que los diferentes algoritmos de trabajo establecidos en el laboratorio, permitieron informar exitosa y oportunamente a las autoridades de salud, ante cualquier evidencia de infección y transmisión de alguna de estas enfermedades.
4. Se encontró un bajo nivel de anticuerpos al sarampión y la rubeola en el grupo de niños de 6 a 10 años de edad, lo que sirvió como soporte a las autoridades de salud para incorporar la reactivación de la vacuna triple viral al programa de inmunizaciones.
5. La detección de avidez de la IgG, mostró ser un método alternativo útil, para la identificación de una infección primaria o secundaria al virus de la rubeola.
6. Se confirmó un brote de rubeola en una población adulta joven, lo que podría dar lugar a la reaparición del SRC.
7. Se evidenció la presencia de parotiditis en la población de adolescentes y adultos jóvenes, debido al mantenimiento de la circulación del virus en la población, lo que dio lugar a la realización de una campaña de vacunación con la triple viral en las edades entre 12 a 24 años en 2006.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar adecuadamente la colección, conservación y transportación de las muestras al laboratorio, así como en la recogida de datos de los pacientes, para la obtención de resultados rápidos y confiables.
2. Incorporar la vigilancia molecular al programa de eliminación del sarampión, la rubeola y la parotiditis.
3. Incorporar la determinación de la avidez de la IgG al virus de la rubeola en el diagnóstico de laboratorio, fundamentalmente en mujeres embarazadas.
4. Sugerir al PNI, el mantenimiento de la vacunación con la triple viral a todo extranjero que arribe al país procedentes de zonas endémicas y a los trabajadores relacionados con actividades de frontera.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdel-Fattah S, Bhat A, Illanes S, Bartha J, Carrington D. TORCH, test for fetal medicine indications: only CMV is necessary in the United Kingdom. *Prenat Diagn.* 2005; 25 (11): 1028-31.
2. Afzal M, Buchanan J, Heath A, Minor P. Clustering of mumps virus isolates by SH gene sequence only partially reflects geographical origin. *Arch Virol.* 1997; 142(2):227–38.
3. Akingbade D, Cohen B, Brown D. Detection of Low-Avidity Immunoglobulin G in Oral Fluid Samples: New Approach for Rubella Diagnosis and Surveillance. *Clin Diag Lab Immunol.* 2003; 10 (1): 189-90.
4. Alvarez M, Marrero M, Soler M, Puig L. Diagnóstico rápido de citomegalovirus en pacientes inmunocomprometidos mediante AcM que reconocen proteínas precoces virales. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1989; 84(2): 265- 68.
5. Andzhaparidze O, Bogomolova N, Boriskina S. Parotitis virus persistence in cell cultures of human origin. *Vopr Virusol.* 1981; 3:335-9.
6. Anónimo^a. Global measles and rubella laboratory network. January 2004 – June 2005 *Morb Mortal Wkly Rep (MMWR).* 2005; 54 (43): 1100 – 4.
7. Anónimo^b. Global distribution of measles and rubella genotypes: update. *Wkly Epid Rec. (WER).* 2006; 81(51/52):474-9.
8. Anónimo^c. Progress toward elimination of rubella and Congenital Rubella Syndrome. The Americas - 2003/2008. *Morb Mortal Wkly Rep (MMWR).* 2008; 57(43): 1176-79.
9. Anónimo^d. Progress Toward measles elimination in WHO's European Region, 2005-2008. *Wkly Epid Rec (WER).* 2009; 8(84/20): 57-64.
10. Anónimo^e. Progress toward the 2012 measles elimination goal – Western Pacific region, 1990-2008. *Morb Mortal Wkly Rep (MMWR).* 2009; 58(24): 669-73.

11. Atreya C, Mohan K, Kulkarni S. Rubella virus and birth defects molecular insights into the viral teratogenesis at the cellular level. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2004; 70 (7): 431 - 37.
12. Backhouse J, Gidding H, McIntyre P, Gilbert G. Evaluation of two enzyme immunoassays for detection of immunoglobulin G antibodies to mumps virus. *Clin Vaccine Immunol.* 2006; 13 (7): 764-7.
13. Bagg J. Common infectious diseases. *Dent Clin North Am.* 1996; 40 (2): 385-93.
14. Bale J. Congenital Infections. *Neurol Clin.* 2002; 20 (4): 1039 – 60.
15. Barhi O, Ben Halima M, Ben Gorbhal M, Dali K, Arrouji Z, Khammassi S et al. Measles surveillance and control in Tunisia : 1979-2000. *Vaccine.* 2003; 21 (5-6): 440 - 45.
16. Barskey A, Glasser J, LeBaron C. Mumps resurgence in the United State: A historical perspective on unexpected elements. *Vaccine.* 2009; 27(44): 6186-95.
17. Bedford H. Mumps: current outbreaks and vaccination recommendations. *Nurs Times.* 2005; 101 (39): 53 - 4.
18. Begue O. Impact of vaccinations on the epidemiology of infective diseases. *Bull Acad Natl Med.* 2001; 185 (5): 927 – 39.
19. Bellini W, Helfand R. The challenges and strategies for laboratory diagnosis of measles in an international setting. *J Infect. Dis.* 2003; 187 (suppl 1): s283 – 90.
20. Bellini W, Rota J, Rota P. Virology of measles virus. *J Infect Dis.* 1994; 170 (suppl 1) : s15 – 23.
21. Benenson A. Manual para el control de las enfermedades transmisibles. Decimosexta edición. Asociación Estadounidense de Salud Pública (SL) OPS; 1997.p.230-49.
22. Bernaola E, Delgado A, Garcés M, Giménez F, Pineda V. Virus de la Parotiditis. [Citado 01/04/05] Disponible en: URL: [http:// www.vacunasaep.org/profesionales/parotiditis.htm](http://www.vacunasaep.org/profesionales/parotiditis.htm)
23. Best J, Castillo C, Spika J, Icenogle J, Glasser J, Gay N. Educing the global burden of congenital rubella syndrome: report of the World Health Organization Steering Committee on Research Related to Measles and Rubella Vaccines and Vaccination. *J Infect Dis.* 2005; 192(11): 1890-7.
24. Best J. Rubella. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2007; 12(3): 182-92.
25. Betancourt A. Epidemiología de las enfermedades inmunoprevenibles. *Arch Venez Puer Ped.* 2000; 63(3): 3-12.

26. Binley J, Arshad H, Fouts T, Moore J. Res Hum Retroviruses AIDS. 1997; 10; 13 (12):1007-15.
27. Bitsko R, Cortese M, Dayan G, Rota P, Lowe L, Iversen S et al. Detection of RNA mumps virus during an outbreak in a population with a high level of measles, mumps and rubella vaccine coverage. J Clin Microbiol. 2008; 46(3): 1101-09.
28. Bloom S, Wharton M. Mumps outbreak among young adults in UK. Bmj. 2005; 331(7508): 363- 4.
29. Bonthius D, Stanek N, Grose C. Subacute Sclerosing Panencephalitis, a measles complication in an internationally adopted child. Emerg Infect Dis. 2000; 6(4): 377 -81.
30. Bronzwaer S, de Groot C. Risk factors for a complicate disease course in children with measles admitted to a Philippine University Hospital. Ned. Tijdschr Geneesk. 1997; 141 (51): 2492 -95.
31. Carbone K, Wolinsky J. Mumps Virus. In: Fields BN, Knipe DM and Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus, ES, editors. Fields Virology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott, Willian and Wilkins. Raven Publishers. 2001. p. 1381-1400.
32. Castillo^a C, Ruiz C, editores. Compendio de artículos sobre rubéola y Síndrome de Rubéola Congénita. Rubella Watch. Proyecto de Inmunización Integral de la Familia/FCH. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Washington DC. 2009.
33. Castillo^b C, Ruiz C, editores. Compendio de artículos sobre sarampión. Sarampión, Rubéola y SRC. Rubella Watch. Proyecto de Inmunización Integral de la Familia/FCH. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Washington DC. 2009.
34. Castillo C, de Quadros C. Accelerated rubella control and the prevention of congenital rubella syndrome. Rev Panam Salud Pub. 2002; 11(4): 273-6.
35. Castilla^a J, Fernández M, Garcia M, Martinez V, Iñigo P, Pestaña M et al. Resurgence of mumps in the vaccine era. Factors involved in an outbreak in Navarre, Spain, 2006-2007. Med Clin (Barc). 2009;133(20):777-82.
36. Castilla^b J, García M, Arriazu M, Fernández M, Martínez-Artola V, Echeverría J et al. Effectiveness of Jeryl Lynn-containing vaccine in Spanish children. Vaccine. 2009; 27(15): 2089 - 93.
37. CDC, Centre for diseases control and prevention. 1990. Mumps. Case definition. Citado [January 9, 2008.] Disponible en: http://www.cdc.gov/ncphi/diss/nndss/casedef/mumps_1990.htm.

38. Chiu H, Yun Lee C, Wei Chih T, Lee P, Chang L, Lin Y et al. Seroepidemiological study of measles after the 1992 nationwide MMR revaccination program in Taiwan. *J Med Virol.* 1997; 51(1): 32 - 5.
39. Ciencia y Tecnología: Más de 6,8 millones de venezolanos vacunados contra la rubéola en 3 semanas[Internet]. Venezuela Bolivariana. com. [Citado el 27/10/2007]. Disponible en: <http://www.venezuelabolivariana.com/modules/news/article>.
40. Cohen B, Parry R, Doblas D, Samuel D, Warrener L, Andrews N. Measles immunity testing: Comparison of two measles IgG ELISAs with plaque reduction neutralisation assay. *J Virol Methods.* 2006; 131(2): 209-12.
41. Colomar M, Puga I, López M, Massot M, Jorquera J, Reina M et al. Neutralization of measles virus infectivity and antibody – dependent cell – mediated cytotoxicity activity against and Epstein Barr Virus infected cells line by intravenous administration of immunoglobulin G. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003; 10(5): 751-56.
42. Concha A, Villaveces A. Guías para el diseño, implementación y evaluación de sistemas de vigilancia epidemiológica de violencia y lesiones. División de control y prevención de enfermedades. Programa de enfermedades no transmisibles. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Serie: HCP/HCN/01.01. Washington DC. Febrero 2001.
43. Cooray S, Warrener L, Jin L. Improved RT-PCR for diagnosis and epidemiological surveillance of rubella. *Clin. Virol.* 2006; 35 (1): 73 – 80.
44. Córdoba P, Grutadauria S, Cuffini C, Zapata M. Presence of a neutralizing domain in isolates of rubella virus in Cordoba, Argentina. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1997, 4(4): 493-5.
45. Cox M, Azevedo R, Massad E, Fooks A, Nokes D. Measles antibody levels in a vaccinated population in Brazil. *R Soc Trop Med Hyg.* 1998; 92(2): 227-30.
46. Cunningham C, Faherty C, Cormican M, Murphy A. Importance of clinical features in diagnosis of mumps during a community outbreak. *Ir Med J.* 2006; 99(6): 171-3.
47. Cutts F, Best J, Siqueira M, Engstrom K, Robertson S. Guidelines for surveillance of congenital rubella syndrome and rubella, field test version. (Document WHO/V&B/99.22). Geneva: WHO; 1999.

48. Davidkina I, Peltolia H, Leimikkia P, Vallea M. Duration of rubella immunity induced by two dose measles, mumps and rubella (MMR) vaccination. A 15 year follow up in Finland. *Vaccine*. 2000; 18 (27): 3106-12.
49. Dayan G, Rota J, Bellini W, Reef S. Measles. In: Roush S, McIntyre L, Baldy L. editors. *VPD Surveillance Manual*. 4th ed. Chapter 7. CDC. Atlanta. 2008. p.1-16.
50. De la Loma A, Villota J, Varela J, Alonso M, de Ory F. Diagnóstico de laboratorio de parotiditis en la era posvacunal. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21(2): 119 – 20.
51. De Melker H, Van den Hof S, Berbers G, Conyn-van Spaendonck M. Evaluation of the national immunization programme in the Netherlands: immunity to diphtheria, tetanus, poliomyelitis, measles, mumps, rubella and Haemophilus Influenzae type b. *Vaccine*. 2003; 21 (7-8): 716-20.
52. De Ory F, Sanz C, García I. La vacuna triple vírica: viejos virus, nuevos problemas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007; 25(4): 227-9.
53. De Quadros C, Olive J, Hersh B, Strassburg M, Henderson A, Brandling – Bennet D et al. Measles elimination in the Americas. Evolving strategies. *JAMA*. 1996; 275 (3): 224 – 29.
54. De Quadros C. Can measles be eradicated globally? *Bull. World Health Org*. 2004; 82 (2): 134 – 38.
55. Dietz V, Rota J, Izurieta H, Carrasco P, Bellini W. The laboratory confirmation of suspected measles cases in settings of low measles transmission: conclusion from the experience in the Americas. *Bull World Health Organ*. 2004; 82 (11): 852 - 7.
56. Domínguez A, Tomer N, Castilla J, Batalla J, Godoy P, Guevara M. Mumps vaccine effectiveness in highly immunized populations. *Vaccine*. 2010; 28 (20): 3567-70.
57. Duclos P, Okwo-Bele J, Gacic-Dobo M, Cherian T. Global immunization: status, progress, challenges and future. *BMC International Health and humans rights*. 2009; 9 (suppl 1): 1-11.
58. Edlich R, Winters K, Long W, Gubler K. Rubella and congenital rubella (German measles). *J Long Term Eff Med Implants*. 2005; 15(3): 319-28.
59. El Mubarak H, Van de Bildt M, Mustafa O, Vos H, Mukhtar M, Groen J et al. Serological and virological characterization of clinically diagnosed cases of measles in suburban Khartoum. *J Clin Microbiol*. 2000; 38 (3): 987 – 91.
60. Elliman D, Sengupta N. Measles. *Curr. Opin. Infect. Dis*. 2005; 18 (3): 229 - 34.

61. Elliott G, Yeo R, Afzal M. Strain-variable editing during transcription of the P gene of mumps virus may lead to the generation of non-structural proteins NS1 (V) and NS2. *J Gen Virol.* 1990; 71:1555 – 60.
62. Enders J, Peebles T. Propagation in tissue cultures of cytopathic agents from patients with measles. *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.* 1954; 86: 277 – 79.
63. Forthal D, Landucci G, Habis A, Zartarian M, Katz J, Tilles J. Measles virus specific functional antibody responses and viremia during acute measles. *J Infect Dis.* 1994; 169(6): 1377 - 80.
64. Fox J, Hazell S, Tobler L, Busch M. Immunoglobulin G Avidity in Differentiation between Early and Late Antibody Responses to West Nile Virus. *Clin Vacc Immunol.* 2006;13 (1): 33–6.
65. Fullerton K, Reef S. Commentary: Ongoing debate over the safety of the different mumps vaccine strains impacts mumps disease control. *Int J Epidemiol.* 2002; 31(5): 983-84.
66. Gemmil I. Mumps vaccine: Is it time to re evaluate our approach. *CMAJ.* 2006; 175(5): 491-2.
67. Germann D, Gorgievski M, Strohle A, Matter L. Detection of mumps virus in clinical specimens by rapid centrifugation culture and conventional tube cell culture. *J Virol Methods.* 1998; 73 (1): 59-64.
68. Gershong A, Krugman S. Measles virus. In: Lennette E, Schmidt N. editors: Diagnostic procedure for viral, rickettsial and chlamidial infections. Chapter 22. 5th Ed. Washington DC. Am Public Health Association. 1979. p.665-93.
69. Gilbert G, Escott R, Gidding H, Turnbull F, Heath T, McIntyre P et al. Impact of the Australian Measles Control Campaign on immunity to measles and rubella. *Epidemiol Infect.* 2001; 127(2): 297-303.
70. Gnann J. Mumps Virus. In: Richman D, Whitley RJ and Hayden FG, editors. *Clinical Virology.* 2nd ed. New York. Churchill. Livingstone Inc. 2002. p. 829- 44.
71. González G, Laferté J, Guzmán M, Rosario D, Rodríguez C. Evaluación de un sistema ultramicroELISA para el diagnóstico de la rubéola. *Rev Cub Med Trop.* 1992; 44 (3): 220 – 23.
72. Gregg N. Congenital cataract following German measles in the mother. 1941. *Aust N Z J Ophthalmol.* 1996; 19(4): 267-76.

73. Griffin D. Measles Virus. In: Fields BN, Knipe D, Howley P et al Editors: Virology. Chapter 44. 5th edition. Philadelphia. Lippincott, Williams & Wilkins 2007. p. 267 – 96.
74. Griffin D, Ward B, Esolen L. Pathogenesis of measles virus infection: a hypothesis for altered immune responses. J Infect Dis. 1994; 170 (suppl 1): S24-31.
75. Griffin B, Verweij M, Wiertz E. Herpesviruses and immunity: The art of evasion. Vet Microbiol. 2010; 143 (1): 89-100.
76. Grillner L, Blomberg J. Hemolysis-in-gel and neutralization tests for determination of antibodies to mumps virus. J Clin Microbiol .1976; 4 (1): 11-5.
77. Gutiérrez J, Maroto C. Serodiagnóstico de la infección vírica: su interés clínico. Control de calidad (SEIMC). [Citado 19/12/04] Disponible en: URL: http://www.seimc.org/control/revi_Sero/Serovir.htm.
78. Hamkar R, Jalilvand S, Mokhtari-Azad T, Nouri Jelyani K, Dahi-Far H, Soleimanzahi H et al. Assessment of IgM enzyme immunoassay and IgG avidity assay for distinguishing between primary and secondary immune response to rubella vaccine. J Virol Methods. 2005; 130 (1-2): 59-65.
79. Haukenes G. Rubella virus. In: Haaheim L, Pattison J, Whitley R. Editors. A practical guide to Clinical Virology. Chapter 15. 2nd Ed. England. John Wiley & Sons, LTD. 2002. p. 105 – 10.
80. Helfand R, Heath J, Anderson J, Maes E, Guris D, Bellini W. Diagnosis of measles with and IgM capture EIA: the optimal timing of specimen collection after rash onset. J Infect Dis. 1997; 30: 2874 – 80.
81. Hersh B, Tambini G, Nogueira A, Carrasco P, de Quadros C. Review of regional measles surveillance data in the Américas. 1996 – 1999. Lancet. 2000; 355(9219): 1943-8.
82. Herzog C. Mumps epidemiology-worldwide. Soz Praventivmed. 1995; 40 (2): 93-101.
83. Hobman T, Chantler J. Rubella virus. In: Fields virology. BN, Knipe D, Howley P et al. Editors. Virology. Chapter 32. 5th edition. Philadelphia. Lippincott William & Wilkins. 2007. p.1069-1100.
84. Hopps H, Parkman P. Mumps Virus. In: Lennette EH, Schmidt NJ, editors. Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections. 5^{ta} ed. Am Public Health Assoc. Washington DC. 1979: 633-53.

85. Ihara, T. Mumps vaccine. *Nippon Rinsho*. 2005; 63 (suppl 5): 612-6.
86. Irons B, Lewis M, Dahl-Regis M, Castillo C, Carrasco P, De Quadros C. Strategies to eradicate rubella in the English Speaking Caribbean. *Am J Public Health*. 2000; 90 (10): 1545 - 49.
87. Ito M, Okuno Y, Hotta H. Comparative analysis of titers of antibodies against measles in sera of vaccinated and naturally infected Japanese individuals of different age groups. *J Clin Microbiol*. 2002; 40 (5): 1733-38.
88. Jin L, Rima B, Brown D, Orvell C, Tecle T, Afzal M et al.. Proposal for genetic characterisation of wild-type mumps strains: preliminary standardisation of the nomenclature. *Arch Virol*. 2005; 150 (9):1903-9.
89. Johnson C, Goodpasture E. The etiology of mumps. *Am J Hyg*. 1935; 21:46–57.
90. Johnson H, Hillary I, Mc Quoid G, Gilmer B. MMR vaccination, measles epidemiology and serosurveillance in the Republic of Ireland. *Vaccine*. 1995; 13 (6): 533 - 7.
91. Kaaijk P, van der Zeijst B, Boog M, Hoitink C. Increased mumps incidence in the Netherlands: review on the possible role of vaccine strain and genotype. *Euro Surveill*. 2008; 13 (26).
92. Kamaci M, Zoslu C, Belhan A. Measles in pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1996; 75 (3): 307 – 9.
93. Kancherla V, Hanson, I. Mumps resurgence in the United States. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 118(4): 938-41.
94. Kaneko M, Sameshima H, Ikenoue T, Minematsu T, Kusumoto K, Ibara S et al. Rubella outbreak on Tokunoshima Island in 2004: serological and epidemiological analysis of pregnant women with rubella. *J Obstet Gynaecol Res*. 2006; 32(5): 461-7.
95. Kanra G, Cetil I, Hicoren Z, Caglar M, Cengiz A, Baykan A et al. Giant cells pneumonia in a leukemic child in remission: a case report. *Turk J Pediatr*. 2001; 43(4): 338 – 41.
96. Kilham L, Murphy H. Propagation of mumps virus in suckling mice and in mouse embryo tissue cultures. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1952; 80:495–98.
97. Kim P, Cappelen-Smith C. Protracted mumps encephalitis with good outcome. *J Clin Neurosci*. 2005; 12(8): 959-61.
98. Knapp W, Holubar K, Wick G. Immunofluorescence and related staining techniques In: VIth International Conference on immunofluorescence and related staining

- techniques. Amsterdam; New York Elsevier/North–Holland Biomedical Press; New York. Elsevier North Holland. Vienna, Austria.1978. April 6-8.
99. Kobune F, Sakata H, Sugiyana M, Sugiura A. B95a marmoset lymphobalstoid cell line, as a sensitive host for rinderpest virus. *J Gen Virol*. 1991; 72 (3): 687 – 92.
100. Kodz B, Domanski M, Wierzchowska A, Dzierka J, Oldak E. Clinical and laboratory features of mumps in hospitalized children in 2003-2004 epidemics. *Przegl Epidemiol*. 2006; 60(2): 299-305.
101. Krause C, Molyneaux P, Ho-Yen D, McIntyre P, Carman W, Templeton K. Comparison of mumps- IgM ELISAs in acute infection. *J Clin Virology*. 2007; 38(2): 153-56.
102. Kremer J, Schneider F, Muller C. Waning antibodies in measles and rubella vaccines – a longitudinal study. *Vaccine*. 2006; 24(14): 2594-601.
103. Kulkarni-Kale U, Ojha J, Manjari G, Deobagkar D, Mallya A, Dhere R. Mapping antigenic diversity and strain specificity of mumps virus: a bioinformatics approach. *Virology* 2007; 359 (2): 436-46.
104. Lamb R, Kolakosfky D. The viruses and their replication. In: Knipe DM and Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, editors. *Fundamental Virology*. 4^{ta} ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins. Raven Publishers. 2001. p. 689-724.
105. Lanzieri T, Segatto C, Siqueira M, De Oliveira E, Prevots R. Borden of Congenital Rubella Syndrome after a community wide rubella outbreak , Rio Branco, Acre, Brazil, 2000-2001. *Pediatr Infect Dis J*. 2003; 22(4): 323-9.
106. Lee J, Bawden D. Rubella virus replication and links to teratogenicity. *Clin Microbiol Rev*. 2000; 13 (4): 571 -87.
107. Lee K, Lee H, Hur J, Kang J, Lee B. Clinical features of measles according to age in a measles epidemic. *Scand J Infect Dis*. 2005; 37 (6-7): 471-5.
108. Lee M, Chien L, Yueh Y, Lu C. Measles Seroepidemiology and decay rate of vaccine induced measles IgG titers in Taiwan, 1995-1997. *Vaccine*. 2001; 19 (32): 4644 – 51.
109. Levenbuk I, Nikolayeva M, Chigirinsky A, Ralf, N, Kozlov, V, Vardanyan, N et al. On the morphological evaluation of the neurovirulence safety of attenuated mumps virus strains in monkeys. *J Biol Stand*. 1979; 7 (1):91– 9.

110. Lim C, Chan K, Goh K, Chow V. Hemagglutinin-neuraminidase sequence and phylogenetic analyses of mumps virus isolates from a vaccinated population in Singapore. *J Med Virol* 2003; 70 (2): 287-92.
111. Lizuka M, Saito H, Yukawa M, Itou H, Shirasaka T, Chiba M. No evidence of persistent mumps virus infection in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2001; 48 (5): 637-41.
112. Lwanga S, Lemeshow S. Determinación del tamaño de las muestras en los estudios sanitarios. Manual Práctico. CDI – UNESCO. Catálogo de Documentos. Ginebra. OMS. 1991.
113. Mac Donald N, Flegel K. Mumps in young adults: the canary in the coal mine. *CMAJ*. 2007; 177(2): 121.
114. Marin M, Nguyen H, Langidrik J, Edwards R, Briand K, Papama M, et al. Measles transmission and vaccine effectiveness during a large outbreak on a densely populated island: implications for vaccination policy. *Clin Infect Dis*. 2006; 42 (3): 315 -9.
115. Mason W. Measles. *Adolesc. Med*. 1995; 6(1): 1-14.
116. Mauldin J, Carbone K, Hsu H, Yolken R, Rubin S. Mumps virus-specific antibody titers from pre-vaccine era sera: comparison of the plaque reduction neutralization assay and enzyme immunoassays. *J Clin Microbiol*. 2005; 43 (9): 4847-51.
117. Mendelson E, Duvdevani P, Varsano N, Lerman Y, Slepon R, Dagan R et al. Measles immunity and response to revaccination of a young adult population in Israel. *J Med Virol*. 1996; 50(3):249-53.
118. Metintass A, Arslantas D, Kalyoncu C, Ucar B. Decay of maternally derived measles antibody in Central Turkey. *Public Health*. 2002; 116 (1): 50 – 4.
119. Meurman O, Teuho P, Salmi A. Activation of rheumatoid factor during pregnancy. *Lancet*. 1978; 2: 685 - 86.
120. MINSAP^a. Ministerio de Salud Pública. Dirección Nacional de Epidemiología. Programa de eliminación del sarampión, rubéola y parotiditis. La Habana. Cuba. 1995.
121. MINSAP^b. Ministerio de Salud Pública La eliminación del sarampión en Cuba. La Habana. Cuba. 1999.

122. MINSAP^c. Ministerio de Salud Pública. La eliminación de la rubéola en Cuba. La Habana. Cuba. 1999.
123. Mitchell L, Tingle A, Mac William L, Home C, Keown P, Gaur L et al. HLA – DR class II associations with rubella vaccine induced joint manifestations. *J Infect Dis.* 1998; 177 (1): 5-12.
124. Molyneux D, Hopkins D, Zagaria N. Disease eradication, elimination and control: the need for accurate and consistent usage. *Trends parasitol.* 2004; 20(8):347-51.
125. Morice A, Carvajal X, Leon M, Machado V, Badilla X, Reef S et al. Accelerated rubella control and congenital rubella syndrome prevention strengthen measles eradication: the Costa Rican experience. *J Infect Dis.* 2003; 187 (suppl 1): s158-63.
126. Mossong J, Putz L, Schneider F. Seroprevalence of measles, mumps and rubella antibodies in Luxembourg: results from a national cross-sectional study. *Epidemiol Infect.* 2004; 132: 11-8.
127. Mubareka S, Richards H, Gray M, Tipples G. Evaluation of Commercial Rubella Immunoglobulin G Avidity Assays. *J Clin Microbiol.* 2007, 45 (1): 231–33.
128. Muhlemann K. The molecular epidemiology of mumps virus. *Infection, Genetic and evolution.* 2004; 4 (3): 213 – 19.
129. Naniche D. Human Immunology of measles virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009; 330: 151 -71.
130. Narita M, Matsuzono Y, Takekoshi Y, Yamada S, Itakura O, Kubota M et al. Analysis of Mumps Vaccine Failure by Means of Avidity Testing for Mumps Virus-Specific Immunoglobulin G. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 1998; 5 (6): 799–803.
131. Navoltropo 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): 1449-51.
132. Ofcansky T. British colonial administration in the Fiji Islands during the 1875 measles epidemic. *Adler Mus Bull.* 1984; 10 (1): 23-7.
133. Okafuji T, Okafuji T, Fujino M, Nakayama T. Current status of measles in Japan: molecular and seroepidemiological studies. *J Infect Chemother.* 2006; 12 (6): 343-48.
134. Okazaki K, Tanabayashi K, Takeuchi K. Molecular cloning and sequence analysis of the mumps virus gene encoding the L protein and the trailer sequence. *Virology* 1992; 188(2):926–30.

135. Olivier C. Mumps. *Rev Prat.* 2002; 52 (13): 1489-92.
- 136.OMS^a. (Organización Mundial de la Salud). Manual de Bioseguridad en el laboratorio de la OMS. [Citado 11/2004]. Disponible en:
<http://www.who.int/csr/resources/publications/bisafety/en/Biosefaty 7.pdf>
- 137.OMS^b (Organización Mundial de la Salud). Manual de los procedimientos diagnósticos de laboratorio para infecciones por los virus del sarampión y rubeola. Segunda edición. Ginebra 14 de julio de 2006. 1-106.
- 138.OMS^c (Organización Mundial de la Salud). Progress Toward Elimination of Rubella and Congenital Rubella Syndrome - the Americas, 2003-2008. *MMWR Weekly.* 2008; 57(43); 1176 - 79.
- 139.OMS^d (Organización Mundial de la Salud). Estrategia Mundial de inmunización.; 61^a Asamblea mundial de la salud. Ginebra 3 de abril de 2008.
- 140.OMS^e (Organización Mundial de la Salud). Erradicación mundial del sarampión. Informe de la Secretaría. 63^a Asamblea Mundial de la Salud. Punto 11.15 del orden del día provisional. A63/18. Ginebra 25 de marzo de 2010; 1-8.
141. OPS^a (Organización Panamericana de la Salud). Normas y Estándares en Epidemiología: Definiciones de Casos: Sarampión y Rubéola. *Boletín Epidemiológico*, 1999; 20 (3).
- 142.OPS^b (Organización Panamericana de la Salud). Measles elimination. Laboratory confirmation of measles elimination. Field Guide. Second Ed. Washington DC, 2005.
- 143.Orestein W. Measles eradication. In: Elimination or eradication strategies. Polio, measles, malaria, rubella. Conference. 11 XIth Advanced Vaccinology Course. May 2010. Merieux Foundation. Annecy, France.
144. Ortuondo E, González I, López L, Echeverría J, de Castro V, Muniozguren N. Brote de parotiditis vírica en un colegio de Bizkaia en 2006. *Rev. Esp. Salud Pública.* 2007; 81(1): 33- 42.
145. Orvell C, Tecle T, Johansson B, Saito H, Samuelson A. Antigenic relationships between six genotypes of the small hydrophobic protein gene of mumps virus. *J Gen Virol.* 2002; 83(10): 2489-96.
146. Ota M, Moss W, Griffin D. Emerging diseases: Measles. *J Neurovirol.* 2005; 11 (5): 447 – 54.

147. Oxman M. Measles. In: Richmand D, Wilthey R, Hayden M. Ed. Clinical Virology. Chapter 35. New York. Churchill. Livingstone Inc. 1997. p. 821 – 61.
148. PAHO. Pan American Health Organization. Integrated Measles/Rubella elimination. In: Measles Elimination. Field Guide. 2nd edition. Washington DC. 2005.
149. Paunio M, Hedmon K, Davidkin I, Valle M, Heinonen O, Leinikki P et al. Secondary measles vaccine failure identified by mesearument of IgG avidity: high occurrence among teenagers vaccinated at a young age. Epidemiol Infect. 2000; 124 (2), 263 – 71.
150. Pebody R, Gay N, Hesketh L, Vyse A, Morgan-Capner P, Brown D et al. Immunogenicity of second dose measles-mumps-rubella (MMR) vaccine and implications for serosurveillance. Vaccine. 2002; 20 (7-8): 1134-40.
151. Peltola H, Heinonen O, Valle M, Paunio M, Virtanen M, Karanko V et al. The elimination of indigenous measles, mumps, and rubella from Finland by a 12-year, two-dose vaccination program. N Engl J Med. 1994; 331(21): 1397-402.
152. Peltola H, Kulkarni P, Kapre S, Paunio M, Jadhav S, Dhere M. Mumps outbreak in Canada and in United Sates: time for new thinking on mumps vaccines. Clin Infect Dis. 2007; 45(4): 459-66.
153. Perry G, Brown D, Parry J, Panday S, Pipkin C, Richards A. Detection of measles, mumps and rubella antibodies in saliva using antibody capture immunoassay. J Med Virol. 1993; 40 (3): 235-40.
154. Plotkin S, Wharton M. Mumps vaccine. In: Plotkin SA, Mortimer Jr EA, editors. Vaccines, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders. 1999. p. 267–92.
155. Plotkin S. Eradication (Elimination) of rubella. In: Elimination or eradication strategies. Polio, measles, malaria, rubella. Conference . 11 XI th Advanced Vaccinology Course . May 2010. Merieux Foundation. Annecy. France.
156. Poland G, Jacobson R. Failure to reach the goal of measles elimination: apparent paradox of measles infections in immunised persons. Arch Intern Med. 1994; 154 (16): 1815 – 20.
157. Prevots R, Salet M, Segatto T, Siqueira M, dos Santos E, Ganter B et al. Interruption of measles transmission in Brazil, 2000 – 2001. J Infect Dis. 2003; 187 (suppl 1): s111 -20.
158. Quiroga R, Barrezueta O, Venczel L, Halkyer P, Gil F, Machicao E et al. Interruption of measles transmission in Bolivia since October 2000. J Infect. Dis. 2003; 187 (suppl 1): s121 -26.

159. Ratnam S, Tipples G, Head C, Fauvel M, Pearon M, Ward B. 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.
160. Rima B, Duprex W. Morbillivirus and human disease. *J Pathol*. 2006; 208 (2): 199 - 214.
161. Rodríguez M, Restrepo C, Uribe G, Javier F, Jaramillo N, Melquizo M. Estado serológico para sarampión en población de 1 a 14 años. Medellín. Colombia. *Colombia Médica*. 1999; 30: 82-8.
162. Rota P, Bellini W. Update on the global distribution of genotypes of wild type measles viruses. *J Infect Dis*. 2003; 187 (Suppl 1): s270-6.
163. Rota P, Featherstone D, Bellini W. Molecular Epidemiology of measles. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009; 330: 129 -50.
164. Roush S, Wharton M. Surveillance indicators. In: Roush S, McIntyre L, Baldy L. editors. *VPD Surveillance Manual*. 4th ed. Chapter 18. CDC. Atlanta. 2008. p. 1-7.
165. Roush S, Hughes H, Wharton M. Enhancing Surveillance. In: Roush S, McIntyre L, Baldy L. editors. *VPD Surveillance Manual*. 4th ed. Chapter 19. CDC. Atlanta. 2008. p. 1-6.
166. Rowe M, Zuo J. Immune responses to Epstein Barr virus: molecular interactions in the virus evasion of CD8⁺T cell immunity. *Microbes Infect*. 2010; 12(3): 173-81.
167. Saika S, Kidokoro M, Kubonoya H, Ito K, Ohkawa T, Aoki A et al. Development and biological properties of a new live attenuated mumps vaccine. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*; 2006; 29 (2-3): 89-99.
168. Sakata H, Tsurudome M, Hishiyama M, Ito Y, Sugiura A. Enzyme-linked immunosorbent assay for mumps IgM antibody: comparison of IgM capture and indirect IgM assay. *J Virol Methods*. 1985; 12(3-4):303-11.
169. Salleras L, Alcaide J. Vacunaciones Preventivas: principios y aplicaciones. En: Salleras L. editor. *Vacunación preventiva*. 2^{da} ed. Barcelona. Masson. 2003. p. 225-26.
170. Samuel D, Sasnauskas K, Jin L, Gidvilaite A, Slibinskas R, Beard S 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): 121-9.

171. Sanz J, de Ory F. Rubella: a new scenario for an old disease. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006; 24 (1): 36 – 44.
172. Sauder C, Vandeburgh K, Iskow R, Malik T, Carbone K, Rubin S. Changes in mumps virus neurovirulence phenotype associated with quasispecies heterogeneity. *Virology*. 2006; 350(1): 48-57.
173. Savage E, Ramsay M, White J, Beard S, Lawson H, Hunjan R et al. Mumps outbreak across England and Wales in 2004: observational study. *BMJ*. 2005; 330 (7500): 1119 - 20.
174. Schlesinger S, Schlesinger M. Togaviridae: The viruses and their replication. In: Knipe D, Howley P. Editors. *Fundamental Virology*. Chapter 19. 4th Ed. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins. 2001: 567- 88.
175. Schmid D, Holzmann H, Alfery C, Wallenko H, Popow-Kraupp T, Allerberger F. Mumps outbreak in young adults following a festival in Austria, 2006. *Euro Surveill*. 2008; 13 (7).
176. Senanayake S. Mumps: a resurgent disease with protean manifestation. *Med J Aust*. 2008; 189 (8): 456-9.
177. Sepúlveda J, Tapia R, Valdespino J, Quiroz G, Zarate M, Magos C y cols. Seroepidemiology of measles in Mexico. *Salud Pública Mexi*. 1992; 34(2): 148-56.
178. Sirvent E, Rodríguez J, Royo G. Rubeola en la embarazada. Control de calidad (SEIMC). Citado en: 2000. Disponible en: http://www.seimc.com/control/revi_Sero/rubéola.htm.
179. Smaron M, Saxon E, Wood L, Mc Carthy C, Morello J. Diagnosis of measles by fluorescent antibody and culture of nasopharyngeal secretions. *J Virol Methods*. 1991; 33 (1-2): 223 – 9.
180. Soler M, Rosario D, Vázquez S, Laferté J, Guzmán M. Estandarización de un sistema ultramicroanalítico indirecto para la determinación de anticuerpos totales al virus del sarampión. *Rev Cub Med Trop*. 1992; 44 (3): 192 – 96.
181. Suárez A. Parotiditis. [Citado 11/03/05] Disponible en: URL: http://www.saludalia.com/docs/Salud/web_saludalia/temas_de_salud/doc/pediatrica/doc/doc_parotiditis1.htm.
182. Sultana R, Rahman M, Hassan Z, Hassan M. Prevalence of IgG antibody against measles, mumps and rubella in Bangladeshi children: a pilot study to evaluate the need for integrated vaccination strategy. *Scand J Immunol*. 2006; 64(6): 684-9.

183. Tanabayashi K, Takeuchi K, Hishiyama M. Nucleotide sequence of the leader and nucleocapsid protein gene of mumps virus and epitope mapping with the in vitro expressed nucleocapsid protein. *Virology*. 1990; 177:124–30.
184. Tangy F, Naim H. Live attenuated measles vaccine as a potential multivalent paediatric vaccination vector. *Viral Immunol*. 2005; 18 (2): 317 – 26.
185. Torner N, Valerio L, Costa J, Parron I, Domínguez A. Rubella outbreak in young adults of Brazilian origin in a Barcelona suburb, October-December 2005. *Euro Surveill*. 2006; 11(2): E0602233.
186. Tuokko H. Comparison of nonspecific reactivity in indirect and reverse immunoassays for measles and mumps immunoglobulin M antibodies. *J Clin Micro*. 1984; 20 (5): 972- 76.
187. Utz J, Kasel J, Cramblett H, Szwed C, Parrott, R. Clinical and laboratory studies of mumps. Laboratory diagnosis by tissue-culture techniques. *N Engl J Med*. 1957; 257 (11): 497-502.
188. Valcarcel Sánchez M. Comportamiento de la parotiditis en Cuba. Años 2000 – 2006 (Tesis Maestría). Ciudad de La Habana. ISCM. 2007.
189. Valero N, Maldonado M. Control, Elimination and eradication of viral immuno preventable diseases in Venezuela. *Invest Clin*. 2005; 46 (3): 207-9.
190. Vauloup-Fellous C, Grangeot-Keros L. Humoral Immune Response after Primary Rubella Virus Infection and after Vaccination. *Clinical and Vaccine immunology*. 2007; 14 (5): 644-47.
191. Vejtor M. Rubella virus antibodies. In: *Methods of Enzymatic*. 3^{er} ed. Ed. Bergmeyer. H.U. 1986: 319 – 36.
192. Venczel L, Dobbins J, Andre J, Laender F, Izurieta H, Delorme P et al. Measles eradication in the Americas: Experience in Haiti. *J Infect Dis*. 2003; 187 (suppl 1): s127 - 32.
193. Vicari A, Dietz V, Bellini W, Icenogle J, Castillo C. Interpretation of Measles and Rubella Serology. In: Andrus J, de Quadros C. Editors. *Recent Advances in Immunization*. 2nd Ed. Pan American Health Organization. Washington DC, 2006. P. 76-86.
194. Weir E, Sider D. A refresher on rubella. *Cmaj*. 2006; 172 (13): 1680-81.

195. WHO^a. World Health Organization. Manual of laboratory methods: for testing of vaccines used in the World Health Organization Expanded Programme on Immunization: determination of measles antibodies by haemagglutination inhibition. Geneva: WHO; 1997.
196. WHO^b. World Health Organization. Recommended Surveillance Standards of mumps, 2^a. edition, Geneva: WHO; June 1999.
197. WHO^c. World Health Organization. WHO recommended standards for surveillance of selected vaccine preventable diseases. Vaccines and Biological. [Citado 03/01/ 2003]. Disponible en URL: <http://www.who.int/vaccine-documents/>.
198. WHO^d. World Health Organization. Global status of mumps immunization and surveillance. Wkly Epidemiol Rec. 2005; 80(48). 418- 24. [Citado 17/02/2010]. Disponible en URL: http://www.who.int/wer/2005/wer_8048.pdf.
199. Wild F. Les infections au virus de la rougeole. Dans: Mege J, Roault D. Immunité et infection. Revillard eds. Arnette Blackwell. Paris. 1997. p.1 – 11.
200. Wilson R, Fuentes S, Wang P, Taddeo E, Klatt A, Henderson A.. Function of small hydrophobic proteins of paramyxovirus. J Virol. 2006; 80 (4): 1700- 09.
201. Wolinsky J. Rubella virus. In: Fields BN, Knipe D, Howley P et al Editors. Virology. Chapter 43. Third ed. Philadelphia. Lippincott Raven Publishers. 1996. p. 899 – 929.
202. Wong-Chew R, Beeler J, Audet S, Santos J. Cellular and humoral immune responses to measles in immune adults re-immunized with measles vaccine. J Med Virol. 2003; 70 (2): 276-80.
203. Wright K, Dimock K, Brown E. Biological characteristics of genetic variants of Urabe AM9 mumps vaccine virus. Virus Res. 2000; 69 (1): 49-57.
204. Yamada A, Takeuchi K, Tanabayashi K. Differentiation of the mumps vaccine strains from the wild viruses by the nucleotide sequences of the P gene. Vaccine. 1990; 8(6): 553-7.
205. Yilmaz D, Senbil N, Aydin O, Yuksel D. Subacute sclerosing panencephalitis in a patient with cerebral palsy. Clin Pediatr. 2005; 44 (3): 259 – 61.
206. Zhamerichiev S. The clinical characteristics of parotid viral infection in adults. Voen Med Zh. 1993; 3: 29-32.
207. Zheng D, Frey T, Icenogle J, Katow S, Abemaly E, Song K et al. Global distribution of rubella genotypes. Emerg Infect Dis. 2003; 9 (12); 1523 – 30.

ANEXO 1

Modelo de recolección de datos sobre muestras para diagnóstico microbiológico o envío de cepas para el trabajo de referencia nacional en el IPK.

1-Nombre(es)		Primer Apellido:		Segundo Apellido:		2-Carné de Identidad: 		No.		
3- Dirección Particular:				4-Municipio:		5-Provincia:		6-Hist. Clínica:		
7-Edad:	8-Sexo: Masc. ☐ Fem. ☐		9-Ocupación		10-Color de la piel: Blanca ☐ Negra ☐ Amarilla ☐ Mestiza ☐				11-Días de ingreso	
12-Centro que Remite:		13-Sala		14-Municipio:		15-Provincia:		16-Fecha: Día Mes Año		
17-Diagnóstico Clínico: 20-Fecha de comienzo de los Síntomas: Día Mes Año 21- GENERALES: Fiebre ☐ Mialgia ☐ Cefalea ☐ Linfadenopatía ☐ Malestar General ☐ Vómitos ☐ Rash ☐ Petequias ☐ Diarreas ☐ Artralgia ☐ Esplenomegalia ☐ Anorexia ☐ Ictero ☐ Hepatomegalia ☐ Astenia ☐ Escalofríos ☐ Sangramiento ☐ Dolor abdominal ☐ Aumento de volumen de parótida ☐ IRA: Tos ☐ Disnea ☐ Expectorcación ☐ Laringitis ☐ Faringitis ☐ Rinorrea ☐ Otitis ☐ Coqueluche ☐ Amigdalitis ☐ Laringotraqueobronquitis ☐ Estornudos ☐ Vacunación anti-Influenza ☐ SNC: Desorientación ☐ Rigidez nuchal ☐ Convulsiones ☐ Pérdida de conciencia ☐ Trastornos de conducta ☐ Dificultad en la marcha ☐ ITS: Secreción Genital ☐ Lesión Genital ☐ SEPSIS URINARIA: Disuria ☐ Otros:						18-Tipo de Muestra colectada: Suero ☐ Sangre ☐ LCR ☐ Humor acuoso ☐ Orina ☐ Líquido amniótico ☐ Gargarismo ☐ Espudo ☐ Heces ☐ Exudado ☐ Cual Tejido ☐ Cual **Lámina de: Cepa de: Fecha colecta muestra: Día Mes Año		19-APP: Enfermedad similar en la familia o comunidad: SI ☐ NO ☐ Historia de viajes al exterior: SI ☐ NO ☐ País: Fecha llegada al país: Día Mes Año Tratamiento Previo: SI ☐ NO ☐ Cuál(es): Antecedente de vacunación PRS SI ☐ NO ☐ Fecha : Día Mes Año		
										22-Estudio solicitado: Diagnóstico ☐ Referencia ☐ 23-SUEROS PAREADOS Fecha de colecta: 1 ^{er} Suero Día Mes Año 2 ^{do} Suero Día Mes Año Confirmatorio (Dengue) ☐ Referencia ☐
24- Nombre del Facultativo:										
25- RESULTADOS										

ANEXO 2

FORMULARIO DE ENCUESTA SEROEPIDEMIOLOGICA ESTUDIO DE ANTICUERPOS A LOS VIRUS DEL SARAMPIÓN, RUBEOLA Y PAROTIDITIS

NOMBRE: _____

EDAD: _____

DIRECCIÓN: _____

MUNICIPIO: _____

INSTITUCIÓN QUE ENVÍA LA MUESTRA: _____

ANTECEDENTES VACUNALES: _____

ANTECEDENTES DE LA ENFERMEDAD: _____

FECHA DE TOMA DE LA MUESTRA _____

ANEXO 3
CONSENTIMIENTO INFORMADO

El que suscribe: _____

Conozco que:

El sarampión, la rubéola y la parotiditis son enfermedades de distribución mundial y que, a pesar de la vacunación, muchas personas aún las padecen anualmente.

Con la incorporación de la vacuna triple viral (sarampión, rubeola y parotiditis), al programa de inmunización en Cuba, la presencia de estas enfermedades ha disminuido grandemente, pero aún existe el peligro de que las mismas puedan ser importadas, procedentes de lugares donde no existe una vigilancia adecuada o el porcentaje de personas vacunadas es muy bajo.

Se me ha informado que el objetivo del presente estudio, es estimar el nivel de anticuerpos contra estas patologías en la población cubana de 7 meses a 23 años de edad, así como conocer los factores que determinan el estado de protección de la población frente a las mismas.

Hago constar por este medio, mi disposición y consentimiento informado, para que se me tome muestra de 10 ml de sangre periférica, para la realización de este estudio.

He leído la información de esta hoja de consentimiento y todas mis preguntas sobre el estudio y participación han sido atendidas, además se me ha informado de que puedo no participar o retirarme del mismo en cualquier momento, sin que por ello vaya a ser motivo de perjuicio.

Para constancia de lo expuesto anteriormente firmo este documento en _____ el día ____ del mes de _____ del 19____.

Firma del paciente o tutor

Nombre y firma del médico