

El virus de la rubéola, clasificado como un *Rubivirus*, es un miembro de la familia *Togaviridae*. Fue aislado por primera vez en 1962, por Parkman, en células de riñón de mono verde africano (AGMK). Clínicamente, produce un cuadro exantemático agudo en niños y adultos, la mayor parte de las veces inaparente. Se transmite por contacto con secreciones nasofaríngeas, sobretodo en la primera semana tras la aparición del exantema. Cuando la enfermedad se adquiere en el transcurso del embarazo, principalmente en el primer trimestre de la gestación, puede producir diversas malformaciones congénitas, descritas por vez primera en 1941 por Sir Norman Gregg, un oftalmólogo australiano que observó un aumento de casos de catarata congénita tras una epidemia de rubéola.

El desarrollo de técnicas diagnósticas se ha dirigido, según las diferentes manifestaciones clínicas, hacia: a) la determinación de la inmunidad frente a la rubéola, b) el diagnóstico de rubéola postnatal, y c) el diagnóstico de la rubéola congénita

DIAGNÓSTICO DIRECTO

Dado que la infección es, en ocasiones, subclínica o leve, el aislamiento del virus es difícil. Se realiza a partir de secreciones faríngeas, orina, líquido amniótico y placenta, en cultivo celular tipo Vero, RK-13 o AGMK, siendo ésta la línea celular estándar. La presencia del virus se detecta por destrucción completa de la monocapa celular y la confirmación se realiza por neutralización con anticuerpos específicos o el fenómeno de interferencia con otros virus, como los Echovirus. En células RK-13 o Vero, el virus produce efecto citopático, pero no siempre es evidente en cultivo primario, y es necesario realizar sucesivos pases para detectarlo. El diagnóstico definitivo se realiza, en estos casos, por inmunofluorescencia directa (IFD).

La amplificación mediante PCR, aplicada a la detección del ARN del virus se realiza transcribiendo a ADNc, que posteriormente se amplifica, pero su aplicación se limita a laboratorios de referencia. En resumen, dada la complejidad tanto del aislamiento en cultivo como de los métodos de PCR, el diagnóstico de elección, en la actualidad, es el serológico.

ANTÍGENOS PARA EL DIAGNÓSTICO INDIRECTO

El virus rubéola tiene antígenos con capacidad hemaglutinante, fijadora de complemento, agregante de plaquetas y precipitante. Posee tres grandes proteínas estructurales: las glucoproteínas E1 y E2, asociadas con la envuelta, y la proteína C de la nucleocápside. Las proyecciones virales contienen, fundamentalmente, la glucoproteína E1 (58.000 Da), donde se localizan, al menos, seis epítomos lineales, de los que cuatro son hemaglutininas, otro es neutralizante y del sexto aún no se conoce su función. En la glucoproteína E2 (42.000-47.000 Da) se han encontrado, hasta el momento, cuatro diferentes antígenos específicos que han permitido diferenciar otras tantas cepas diferentes de virus con idéntica hemaglutinina E1. La proteína C (33.000 Da) tiene dos epítomos para las células B, y uno para las T.

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Existe una gran variedad de métodos en el mercado que nos permiten escoger entre: inhibición de la hemaglutinación, hemaglutinación pasiva, hemólisis radial, fijación de complemento, inmunofluorescencia indirecta (IFI), aglutinación con látex (AL) e inmunoanálisis (EIA), así como métodos más precisos y laboriosos que implican la separación de las diferentes inmunoglobulinas.

Inhibición de la hemaglutinación (IH)

En 1970 se estandarizó la IH como método de referencia y este protocolo se adoptó por el National Committee for Clinical Laboratory Standards. La prueba detecta anticuerpos frente a la hemaglutinina viral E1, por bloqueo de la capacidad del virus de aglutinar hematíes de determinadas especies. Los empleados con más frecuencia son los hematíes de paloma, de pollito recién nacido o humanos, del grupo O. Se considera una Unidad Hemaglutinante (UH) la máxima dilución de antígeno capaz de hemaglutinar una suspensión de hematíes al 0,25%; para la titulación de los sueros se emplean cuatro UH.

Este tipo de anticuerpos comienzan a formarse en los primeros días del contacto con el virus, se encuentran, por lo general, presentes cuando aparece el exantema, alcanzando la concentración más elevada en la fase de convalecencia, y permanecen de por vida. La técnica elimina los inhibidores no específicos de la hemaglutinación (lipoproteínas) y las hemaglutininas inespecíficas, mediante absorción con caolín y una suspensión de hematíes al 50%, evitando así que puedan provocar falsos positivos o falsos negativos. Una vez tratado, el suero queda diluido al 1/8, que es la dilución de partida. El título de anticuerpos será la máxima dilución a la que se inhibe totalmente la hemaglutinación. Se considera que existe inmunidad, un título igual o superior a 1/8, que equivale a 15 UI/ml.

A pesar de la amplia utilización de esta técnica durante años, y de ser el método de referencia, la complejidad de su desarrollo y

la necesidad de personal experto ha hecho que, en los últimos tiempos, se haya ido abandonando en favor de técnicas más sencillas y automatizadas.

Fijación de complemento

Es un método laborioso y está estandarizado desde 1965; presenta poca aplicación práctica en el diagnóstico de rubéola, por detectar anticuerpos a partir de los 20 días de comienzo del cuadro clínico. Sólo es útil cuando la muestra se recoge en la fase de convalecencia y la seroconversión ya se ha producido. Respecto a la detección del estado inmunitario, es una prueba cara y que necesita personal especializado, por lo que se ha utilizado poco.

Hemaglutinación pasiva

Tiene gran utilidad para el conocimiento del estado inmunitario frente a la rubéola de la población; es rápida y económica. Emplea eritrocitos estabilizados y posteriormente sensibilizados con antígeno de rubéola. Los eritrocitos aglutinan en presencia de anticuerpos específicos, en placas de microtitulación de fondo en V. Deben de colocarse en cada ensayo controles positivos y negativos y un control de hematíes no sensibilizados. La cinética de los anticuerpos medida por este método es similar a las de la IH, EIA, IFI y AL.

Hemólisis radial

Es un buen método para medir el estado inmunitario de la población. Está estandarizado por Russell desde 1978. Se utilizan hematíes frescos de cordero que, tras sensibilizarlos con el antígeno E1, se mezclan a 43 °C con complemento de cobaya y con agarosa al 0,8%, vertiéndose en placas de Petri, que pueden ser conservadas a 4°C. En estas placas se realizan, con un sacabocados, pocillos de 3 mm. Los sueros descomplementados se colocan en los pocillos y se dejan toda la noche a 4°C en cámara húmeda; posteriormente, se incuban las placas 2 horas a 37 °C y se lee el halo de hemólisis producido. Se consideran indicativos de inmunidad diámetros de halo mayores de 5 mm. Si la hemólisis producida es incompleta, se coloca en el pocillo complemento de cobaya y se reincuba. La precocidad de esta prueba es algo menor que la de la IH, pues detecta anticuerpos tras la fase de exantemática, por lo que no se suele emplear para el diagnóstico.

Aglutinación con látex

Es una prueba rápida, que se utiliza sobretodo para la determinación del estado inmunitario. Se basa en la unión del antígeno a una partícula de látex que, al ponerse en contacto con los anticuerpos, aglutina de forma visible. La sensibilidad de la prueba es buena, detectando los anticuerpos al mismo tiempo que la IH e IFI. Tiene el inconveniente de ser una prueba manual y que debe realizarse muestra por muestra, por lo que está indicada en laboratorios con pequeño número de muestras. Además, puede presentar fenómeno de zona, por lo que las muestras negativas deben diluirse, lo que alarga aún más el proceso.

Inmunofluorescencia indirecta

Utiliza células LLC-MK infectadas por el virus. Las células tripsinizadas se depositan en portas, donde se fijan y sirven de sustrato para la reacción. El antígeno, localizado en el citoplasma de las células, fija anticuerpos específicos del virus y se detecta mediante una anti-gammaglobulina humana conjugada con fluoresceína, pudiendo diferenciar, según el tipo de ésta, entre anticuerpos IgM e IgG. Este método, relativamente económico y de no muy compleja realización, tiene la desventaja de la interpretación subjetiva. Para evitar esto, se creó el método FIAX, variante de la IFI, en la que el antígeno soluble se inmoviliza en un palillo, sobre una superficie opaca plana de plástico, cuya cara posterior, del mismo material plástico, se utiliza como control. Este palillo se incuba con el suero y, posteriormente, con el conjugado, leyéndose con un fluorímetro. La fluorescencia inespecífica que pueda producirse queda eliminada al restar a la fluorescencia producida por la reacción antígeno-anticuerpo la correspondiente al control de la superficie plástica, que fue sometida al mismo proceso.

Este método tiene la misma sensibilidad que la IH, AL y el EIA, y permite la diferenciación entre los distintos tipos de inmunoglobulinas. Está especialmente indicado para el diagnóstico de la infección congénita y postnatal, pero es caro y lento de realizar, pues debe leerse muestra por muestra, de forma individual. Tras una gran utilización, por su gran sensibilidad, durante la década de los ochenta, en la actualidad ha sido sustituido en la mayor parte de los laboratorios por otras técnicas más rápidas y automatizadas.

Enzimoanálisis

Todos los EIA comerciales se basan en la fijación del antígeno a una fase sólida, generalmente placas de microtitulación. Los antígenos varían según el fabricante pero suelen ser E1, E2 y C. La lectura es colorimétrica y, en la actualidad, estos métodos están perfectamente automatizados, pudiendo detectar IgG o IgM. Hay variantes técnicas, según la firma comercial: EIA de captura, en *sandwich*, competitivo, determinantes de la avidéz, etc. Cada método comercial tiene sus características propias de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo.

La detección de IgM emplea, en el caso de EIA de captura, la unión a la cadena pesada anti- μ en el fragmento Fab, con lo que se evitan falsos positivos, o bien se absorbe el factor reumatoide y las IgG, previo tratamiento del suero, lo que evita falsos positivos y negativos, respectivamente.

Las técnicas EIA detectan anticuerpos en la fase inicial de la enfermedad y son adecuadas tanto para el diagnóstico de la infección como para conocer el estado inmunitario, ya que las IgG pueden durar de por vida, mientras que las IgM suelen detectarse hasta los 2 meses después del comienzo del exantema. En las reinfecciones puede observarse un incremento del título de IgG, o la reaparición, aunque débil, de las IgM. Hay que tener en cuenta la posible reacción cruzada con otros virus que puede originar valores bajos de IgM, falsamente positivos.

Los métodos MEIA y ELFA son variaciones de la técnica que utilizan un sustrato fluorescente y que están totalmente automatizados. Otra posibilidad actual es la medición de la avididad de los anticuerpos por su antígeno; en la infección reciente, la avididad es alta.

Hoy en día, las técnicas EIA son las más universalmente utilizadas, pero hay que tener bien presente que no todos los equipos comerciales tienen las mismas características, por lo que, dentro del abanico de ofertas, deberemos buscar uno con buena reproducibilidad y valores predictivos positivo y negativo.

Detección de anticuerpos IgM específicos

En los años setenta, las técnicas en uso no permitían la detección sencilla de anticuerpos de la clase IgM, por lo que se realizaba un fraccionamiento de los sueros en gradientes de sacarosa, en los que se separaban las fracciones 2, 3 y 4 que correspondían a las IgM, y las 6, 7, 8 y 9 representativas de las IgG. Estas fracciones, una vez eluidas, se sometían a IH, lo que permitía el diagnóstico de infección congénita. La aparición de nuevas técnicas como las EIA ha dejado en desuso este método. Otros intentos de separar las inmunoglobulinas, como la filtración en gel, la absorción con proteína A del estafilococo, la cromatografía en columna de Sephadex o la destrucción con 2-mercaptoetanol, tuvieron un peor resultado, aunque también fueron utilizadas en su momento.

UTILIZACIÓN DE LOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Habida cuenta que, como anteriormente ya hemos apuntado, las pruebas de diagnóstico directo están reservadas para centros de referencia, en el laboratorio clínico y de forma práctica podremos escoger la técnica serológica que más se adecue a nuestras necesidades diagnósticas.

Determinación de la inmunidad frente a la rubéola

Se aplica a las gestantes en las que no se conoce su estado inmunitario o a personas vacunadas, para valorar la eficacia de la vacuna. En este caso, deberemos contar con técnicas sensibles que nos permitan medir cantidades mínimas de anticuerpos totales, sin ser necesaria una cuantificación de los resultados. Se suele recomendar, en esta situación, la IH, hemaglutinación pasiva, hemólisis radial, aglutinación con látex, o las técnicas de IFI o EIA.

Diagnóstico de la rubéola postnatal

Esta situación se produce ante un cuadro de infección aguda exantemática o en la sospecha de contacto en una gestante. En este supuesto es imprescindible un método que nos permita diferenciar entre IgG e IgM específica, o bien una técnica que detecte anticuerpos de forma sensible y temprana, como la IH, IFI, EIA. Es muy útil poder contar con una buena seroteca, o con un estudio previo del paciente frente a rubéola, pues la existencia de una muestra anterior de suero nos ayudaría en gran manera a llegar a un diagnóstico de forma rápida, ya que el procesamiento de esta muestra antigua en paralelo con la actual, en el caso de ser positiva para IgG, nos descarta la existencia de una infección primaria.

Esta muestra previa es especialmente importante en las reinfecciones, que aunque poco frecuentes, son posibles. La existencia de IgG e IgM específica frente a rubéola en la primera extracción de un control rutinario en una gestante no nos permite diferenciar entre primoinfección subclínica o reinfección.

En el caso de no tener un anterior control deberá tomarse otra muestra a los 5-7 días de la primera. En ausencia de datos previos, un resultado positivo para IgG y negativo para IgM, debe de comprobarse con la 2ª muestra; si a los 7-10 días del cuadro clínico no detectamos IgM específica, se descarta la infección por rubéola. Si se evidencia la presencia de IgM en la primera determinación, en ausencia de datos previos, la segunda muestra nos detectará la seroconversión de IgG y nos confirmará el diagnóstico de infección por rubéola. La ausencia de anticuerpos de las clases IgG e IgM en las dos muestras, descarta la infección.

Diagnóstico de la rubéola congénita

Esta situación puede producirse antes o después del parto. En el supuesto de haber detectado una seroconversión a la rubéola en el transcurso de la gestación, la necesidad de diagnosticar la infección fetal ha llevado a la realización de pruebas como la cordocentesis que, en el caso de resultar negativa, no excluye la infección. En estas circunstancias, parece indicada la realización de un estudio de ARN del virus en líquido amniótico o sangre fetal.

Bosma *et al.* (1995) evaluaron el papel de la RT-PCR en el diagnóstico de la rubéola adquirida *in utero* y durante la infancia, comparándola con el aislamiento vírico retrospectivo en placenta y tejido fetal. Llegaron a la conclusión de que, a pesar de las limitaciones, es muy útil en el diagnóstico de la rubéola infantil adquirida congénitamente. Sin embargo, no siempre predice la infección fetal en los casos de rubéola materna. Este grupo de investigadores detectó mediante RT-PCR genoma de rubéola en dos casos en los que el feto no llegó a infectarse. Por el contrario, no fue detectado en la placenta en un caso en el que el feto sí lo estaba.

El diagnóstico postnatal tiene unos criterios publicados por el CDC y recogidos por la OMS desde 1985. Se resumen en lo siguiente: a) la detección al nacimiento de IgM específica en sangre de cordón o en los primeros días de vida extrauterina, b) mantenimiento de los títulos de IgG más allá de los primeros 8 meses, y c) detección de ARN viral en el recién nacido.

Por lo que respecta a los métodos serológicos aplicables al diagnóstico de la rubéola congénita, el laboratorio debe utilizar

técnicas sensibles y que sean capaces de diferenciar entre las distintas inmunoglobulinas como la IFI, EIA o sus variantes MEIA y ELFA. Como conclusión, y debido a la importancia de un diagnóstico rápido y correcto ante la sospecha de una rubéola congénita, recordamos la utilidad de mantener en activo una seroteca y un sistema informático que nos permita la utilización de muestras anteriormente extraídas que, como mínimo, debería de abarcar un período de 5 años.

Por otra parte, en laboratorios que no sean de referencia, no parece indicado el tener a punto dos o tres técnicas para el diagnóstico de esta infección, por lo que es recomendable la utilización de una sola de ellas que sea capaz de abarcar todos los problemas, tanto el estado inmunitario como la infección activa, y que permita la diferenciación entre inmunoglobulinas IgG e IgM.

BIBLIOGRAFÍA

Parkman PD, Buescher EL, Artenstein MS. Recovery of rubella virus from army recruits. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962; 111:225-230.

Gregg NM. Congenital cataract following german measles in the mother. *Trans Ophthalmol Soc Aust* 1941; 3:35-46.

Herrmann KL. Rubella virus. En: Lennette EH, N.J. Schmitdt NJ (eds), *Diagnostic Procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. 5ª ed. American Public Health Association, Washington DC 1979, pp 725-766.

Anónimo. US Public Health Service. Standardized diagnostic complement fixation method and adaptation to microtest. *Public Health Monograph* 74. US Government Printing Office, Washington DC 1965.

Russell SM, Benjamin SR, Briggs M, Jenkins M, Mortimer PP, Payne SB. Evaluation of the single radial hemolysis (SRH) technique for rubella antibody measurement. *J Clin Pathol* 1987; 31:521-526.

Abbott GG, Saffor JW, MacDonald RG, Craine MC, Applegreen RR. Development of automated immunoassay for immune status screening and serodiagnosis of rubella virus infection. *J Virol Methods* 1990; 27:227-240.

Thomas HIJ, Morgan P. The use of antibody avidity measurements for the diagnostic of rubella. *Rev Med Virol* 1991; 1:41-50.

Chernesky MA, Wyman L, Mahony JB, Castriciano S, Unger T, Safford JW, Metzger PS. Clinical evaluation of the sensitivity and specificity of a commercially available enzyme immunoassay for detection of rubella virus specific immunoglobulin M. *J Clin Microbiol* 1984; 20:400-404.

Pedneault L, Zrein M, Robillard L, Landry F, Lacroix M, Joncas J. Comparison of novel synthetic peptide-based DETECT-RUBELLA enzyme immunoassays with Enzygnost and Imx for detection of rubella-specific immunoglobulin G. *J Clin Microbiol* 1994; 32:1085-1087.

Grangeot-Keros L, Pustowoit B, Hobman T. Evaluation of Cobas Core Rubella IgG EIA recomb, a new enzyme immunoassay based on recombinant rubella-like particles. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2392-2394.

Grangeot-Keros L, Enders G. Evaluation of a new enzyme immunoassay based on recombinant rubella virus-like particles for detection of immunoglobulin M antibodies to rubella virus. *J Clin Microbiol* 1997; 35:398-401.

Bosma TJ, Corbett KM, Eckstein MB, O'Shea S, Vijayalakshmi P, Banatvala JE, Morton K, Best J. Use of PCR for prenatal and postnatal diagnosis of congenital rubella. *J Clin Microbiol*. 1995; 33:2881-2887.

Anónimo. Centers for Disease Control. Rubella and congenital rubella syndrome. United States 1984-85. *MMWR* 1986. 35:129-135.