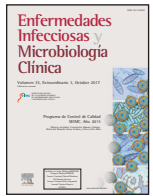




Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Enfermedades exantemáticas virales: aspectos clinicoepidemiológicos y de laboratorio

Aurora Fernández García^{a,b}, Serena Villaverde González^c, Juan Emilio Echevarría Mayo^{a,b}, María José Cilleruelo Ortega^c y Fernando de Ory Manchón^{a,b,*}

^aCentro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España

^bCentro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBER ESP), Madrid, España

^cHospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid, España

RESUMEN

Palabras clave:

Exantemas virales
Sarampión
Rubéola
Eritema infeccioso
Exantema súbito
Varicela
Enfermedad boca-mano-pie
PCR
Diagnóstico serológico

Los cuadros exantemáticos tienen frecuentemente origen infeccioso; los virus son una causa importante de exantema. Los exantemas más relevantes son, entre los maculopapulosos, el sarampión, la rubéola, el eritema infeccioso y el exantema súbito y, entre los vesiculoampollosos, la varicela, el zóster y la enfermedad boca-mano-pie. Algunas de las anteriores, y otras infecciones virales, causan exantemas purpúricos que pueden ser de mayor gravedad. El diagnóstico de laboratorio se realiza de forma directa, mediante el aislamiento, la detección de antígenos o la detección del ácido nucleico viral, siendo esta última la aproximación más adecuada; o, serológicamente, por detección de IgM específica, que proporciona diagnóstico temprano, o de seroconversión. En general, ambas herramientas metodológicas se complementan para mejorar el rendimiento diagnóstico. La caracterización molecular es una importante actividad de laboratorio, especialmente para los virus del sarampión y de la rubéola, en el contexto del plan de eliminación de estas enfermedades.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Exanthematous viral diseases: clinical and laboratory aspects

ABSTRACT

Keywords:

Viral Exanthems
Measles
Rubella
Erythema Infectiosum
Exanthema Subitum
Chickenpox
Hand-Foot-and-Mouth Disease
PCR
Serological Diagnosis

Exanthematous diseases frequently have an infectious origin; viruses are a major cause of rashes. The most notable maculopapular rashes are measles, rubella, infectious erythema and exanthem subitum, while the vesicular rashes include varicella (and zoster) and hand-foot-and-mouth disease. Some of the above and other viral infections cause purpuric rashes, which may be more severe. Laboratory diagnosis is performed directly, by viral isolation, antigen detection or viral nucleic acid detection, the latter being the best approach; or serologically, by detection of specific IgM (providing rapid diagnosis) or seroconversion. Both methodological tools generally complement each other to improve diagnostic performance. Molecular characterization is an important laboratory procedure, especially for the measles and rubella viruses, in the context of the plan for the elimination of these diseases.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

*Autor para la correspondencia.

Correo electrónico: fory@isciii.es (F. de Ory Manchón).

Introducción

Un exantema es una erupción en la piel que puede tener múltiples causas, entre las que se incluyen inflamaciones, reacciones a medicamentos e infecciones. Los exantemas infecciosos pueden estar causados por bacterias, parásitos y virus. Las enfermedades exantemáticas más frecuentes en la infancia están producidas por virus: sarampión (primera enfermedad), rubéola (tercera), varicela (cuarta), eritema infeccioso (quinta) y exantema súbito (sexta enfermedad). Además, otros virus producen también enfermedad exantemática de forma menos frecuente (tabla 1). De estas enfermedades, el sarampión y la rubéola se encuentran en proceso de eliminación promovido por la Organización Mundial de la Salud (OMS), puesto que son enfermedades que presentan características que lo hacen posible: el ser humano es su único reservorio; existe una vacuna segura y efectiva que produce una inmunidad duradera; el virus no produce infección crónica, y existen métodos de diagnóstico sensibles y específicos. En España está en vigor el Plan Nacional de Eliminación del Sarampión desde el año 2000¹, en el que se incluyó la eliminación de la rubéola y el síndrome de rubéola congénita (SRC) en el año 2008. Este plan concreta los objetivos coordinados para conseguir y mantener la eliminación de estas 2 enfermedades. A medida que se progresa hacia la eliminación se hará más relevante el diagnóstico etiológico de los exantemas virales. En este contexto resulta de gran interés la revisión de los aspectos clínicos, epidemiológicos, de diagnóstico de laboratorio y de caracterización molecular de los virus que producen exantemas.

Enfermedades exantemáticas virales: aspectos clínicoepidemiológicos

Existen diversas clasificaciones de los exantemas virales; la más utilizada se refiere a las características clínicas y los divide básicamente en 2 grupos: exantemas maculopapulosos y vesiculoampollosos (tabla 1). Algunos virus que producen estos tipos de exantemas (virus dengue [VD], virus sarampión [VS]) —junto con otros menos frecuentes (virus del Ébola, virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-

Congo)— pueden producir igualmente exantemas purpúricos de mayor gravedad.

Exantemas maculopapulosos

Sarampión. Es una infección altamente contagiosa producida por un virus de la familia *Paramyxoviridae*, que contiene ARN monocatenario como material genético. El genoma de este virus está formado por 6 unidades de transcripción que codifican la nucleoproteína, fosfoproteína, proteína de la matriz (M), proteína de fusión (F), hemaglutinina (H) y la ARN polimerasa². Se transmite por vía respiratoria, infectando el tracto respiratorio superior y los ganglios linfáticos regionales. Las personas infectadas pueden transmitir el virus desde 4 días antes del comienzo del exantema hasta 4 después de su desaparición³.

La OMS se ha planteado la eliminación del sarampión, sobre la base de una elevada cobertura vacunal (> 95%) y de un sistema de vigilancia epidemiológico exhaustivo, basado en el estudio individual de casos^{4,5}.

La vacuna triple viral (rubéola, sarampión y parotiditis) se introdujo en España en 1981 y modificó sustancialmente la incidencia de sarampión, que actualmente es < 1 caso/100.000 habitantes, con una cobertura vacunal superior al 95% a nivel nacional. En cuanto a la vigilancia epidemiológica, con el establecimiento del Plan Nacional de Eliminación del Sarampión¹ pasó a ser una enfermedad de declaración obligatoria urgente; por lo que cada caso sospechoso (con fiebre, temperatura corporal superior a 38 °C y exantema maculopapuloso con al menos 1 de estos 3 síntomas: tos, rinitis/coriza y conjuntivitis⁶) debe ser declarado a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) e investigado de forma exhaustiva⁶.

A pesar de los esfuerzos realizados, el sarampión continúa siendo una de las principales causas de mortalidad infantil en el mundo, con 134.200 muertes en 2015⁷. Además, se considera una enfermedad reemergente en los países desarrollados, donde en los últimos años se están registrando grandes brotes. En Europa ha habido un aumento notable del número de casos desde 2010⁸. En España se produjo en 2011 un aumento de la incidencia a 7,45 casos/100.000 habitantes y se confirmaron 5.107 casos entre 2011 y 2012, con declaración de casos en todas las comunidades autónomas^{9,10}. Estos brotes se deben a la acumulación de individuos susceptibles en determinados grupos de población (lactantes con edad inferior a la de vacunación [< 12 -15 meses], individuos nacidos en la época del establecimiento de la vacunación, población nómada o marginal sin vacunar), y a la aparición de movimientos antivacunas. Afortunadamente, estas cifras han descendido hasta las actuales (en torno a 0,08 casos/100.000 habitantes en 2015) y desde 2014 se ha conseguido, además, eliminar la transmisión endémica¹¹.

Desde el punto de vista clínico, se puede dividir la infección en 4 fases. El período de incubación dura de 7 a 18 días, habitualmente 12 días tras la entrada del virus en el tracto respiratorio superior, con replicación a este nivel y diseminación al torrente sanguíneo, dando lugar a una primera viremia. De forma típica, los pacientes permanecen asintomáticos durante este período. Posteriormente tiene lugar una segunda viremia que marca el inicio de la fase prodrómica, en forma de cuadro catarral asociado a fiebre elevada, conjuntivitis, tos y aparición en algunos casos de las patognomónicas manchas de Koplik (lesiones puntiformes blanco-grisáceas en mucosa bucal opuesta a los molares inferiores). Esta fase suele durar 2-4 días y se intensifica en las 24-48 h previas a la aparición del exantema. A continuación se desarrolla un exantema maculopapuloso eritematoso que comienza en la cabeza y se extiende de forma caudal y centrífuga, en ocasiones de forma confluyente, resolviéndose con el mismo patrón y dejando una coloración parduzca y descamación. La extensión de las lesiones cutáneas se relaciona con la gravedad de la infección. Durante la fase exantemática pueden observarse datos de infiltración del sistema reticuloendotelial en for-

Tabla 1
Enfermedades exantemáticas más frecuentes causadas por virus

	Virus	Enfermedad
Exantemas maculopapulosos	Sarampión	Sarampión
	Rubéola	Rubéola
	<i>Erythrovirus</i> B19	Eritema infeccioso
	Herpesvirus humano 6	Exantema súbito
	Herpesvirus humano 7	
	Enterovirus	Enfermedad por enterovirus
	Epstein Barr	Mononucleosis infecciosa
	Citomegalovirus	
	Dengue	Dengue
	Chikungunya	Fiebre chikungunya
Exantemas vesiculoampollosos	Zika	Enfermedad por zika
	Herpes simple	Herpes
	Varicela-zóster	Varicela y herpes zóster
	Coxsackie, enterovirus 71	Enfermedad boca-mano-pie

ma de adenopatías cervicales, esplenomegalia y adenitis mesentérica. Finalmente, tiene lugar la fase de recuperación, en la que desaparecen el exantema y la fiebre¹². Tanto la fiebre como el exantema pueden no aparecer en niños muy pequeños, pacientes inmunodeprimidos, niños malnutridos y en individuos previamente vacunados².

La tasa global de complicaciones se acerca al 30%, y las más comunes son las que derivan de la supresión transitoria de la respuesta de células T producida por la infección de estas células por el virus, y que predisponen al desarrollo de infecciones bacterianas graves: fundamentalmente neumonía y otitis media¹³. Asimismo, se han descrito complicaciones neurológicas en forma de encefalitis aguda producida de forma directa por el virus o como respuesta autoinmune posinfecciosa en el caso de la encefalomiелitis aguda diseminada. Por último cabe reseñar la panencefalitis esclerosante subaguda (PEES), enfermedad degenerativa con desenlace fatal que ocurre de 7 a 10 años tras la infección, generalmente en niños que presentaron la enfermedad durante el primer año de vida, debido a inmadurez en la inmunidad celular. La PEES está relacionada con cepas del virus que escapan a la respuesta inmune y persisten en neuronas y células gliales del cerebro. En la PEES se han considerado relevantes las mutaciones en las proteínas M, F y H¹⁴.

Rubéola. Está producida por un virus de la familia *Togaviridae* que contiene ARN monocatenario como material genético¹⁵. Es una enfermedad de transmisión respiratoria. En España, desde la introducción de la vacunación, el descenso en su incidencia ha sido notable; especialmente después de alcanzarse coberturas superiores al 95%. Es obligatoria la declaración individualizada de cada caso a la RENAVE. En la actualidad se trata de una infección de muy baja incidencia en España: 0,009 casos/100.000 habitantes en 2015¹¹.

La mayor trascendencia de la rubéola es la infección durante el embarazo, que puede ocasionar transmisión intrauterina y dar lugar al SRC. Por ello, la OMS ha elaborado un plan estratégico de prevención de la infección congénita por rubéola. Entre otros puntos, se establece que la protección frente al virus de las mujeres en edad fértil debe ser superior al 95%. A pesar de que en la mayor parte de las regiones de Europa la cobertura vacunal supera el 95%, en algunos países (Italia, Rumanía, Polonia) la vacunación se ha introducido de forma sistemática durante la última década; por lo que hay una alta susceptibilidad a la infección, lo que explicaría los últimos brotes de rubéola en estos países^{16,17} y los casos detectados en España en personas procedentes de dichos países.

La enfermedad comienza con una fase prodrómica (que sigue a un período de incubación de 14-21 días) caracterizada por febrícula asociada típicamente a adenopatías retroauriculares y occipitales dolorosas, que suele durar 24-48 h. Posteriormente aparece un exantema maculopapuloso no confluyente, rosáceo, con extensión cefalocaudal; en el 20% de los casos aparecen las manchas de Forchheimer en paladar blando, no específicas de rubéola¹⁸. De acuerdo con la RENAVE, la definición de caso se refiere a la aparición súbita de un exantema maculopapuloso generalizado y debe cumplir al menos uno de los 5 criterios siguientes: adenopatía cervical, suboccipital o retroauricular, artralgias y artritis⁵.

La infección congénita es más grave cuanto más precoz sea la infección durante el embarazo. El SRC clásico se caracteriza por la tríada de Gregg (cardiopatía, microcefalia, sordera y cataratas) que aparece en el 85-90% de los fetos infectados antes de la semana 12 de gestación. Si la infección materna tiene lugar entre las 12 y las 16 semanas, el 15% de los fetos presenta sordera y, en menor proporción, defectos oculares y microcefalia. Cuando la infección se produce entre las 16 y las 20 semanas, el riesgo de sordera es mínimo y en infecciones adquiridas a partir de las 20 semanas de gestación no se han descrito secuelas congénitas. Sin embargo, cuando la infección materna se produce al final del embarazo, el recién nacido podría presentar infección sistémica con erupción generalizada y lesiones purpúricas, aunque sin presentar malformaciones asociadas¹⁹.

Eritema infeccioso (megaloeritema o quinta enfermedad). Causado por el *Erythrovirus B19* (EB19), familia *Parvoviridae*. Es un virus con ADN monocatenario, cuya característica más importante es su afinidad por el antígeno P eritrocitario. Esta condición conduce a la replicación en las células madre eritroides y es causa de crisis aplásicas transitorias en los pacientes infectados con enfermedad hematológica previa²⁰. Se transmite por vía respiratoria y parenteral.

Se trata de una infección frecuente, con una prevalencia que aumenta con la edad. Aparece fundamentalmente en primavera y verano, con brotes cada 3 años. El cuadro clínico comienza con manifestaciones inespecíficas como fiebre, mialgias y cefalea y el exantema aparece 7-10 días después. El exantema típico comienza en la cara, con aspecto de "mejillas abofeteadas"; días más tarde se extiende al tronco, y finalmente se desvanece dando lugar a un aclaramiento central (exantema reticular en encaje). La infección en el adulto puede producir un exantema atípico (p. ej., en forma de guante-calcetín)²¹, o artritis o artralgias, que pueden persistir durante meses. Cabe destacar que la infección primaria durante el embarazo puede desencadenar anemia fetal grave con una elevada morbilidad.

Exantema súbito (roséola infantil o sexta enfermedad). Los agentes causales de esta enfermedad típica de la edad pediátrica son los virus del herpes humano (VHH) tipo 6 (VHH-6) —fundamentalmente VHH-6B— y menos frecuentemente el VHH-7 (familia *Herpesviridae*). El 90% de los casos se produce entre los 6 meses y los 3 años; se presenta en forma de fiebre elevada durante 3-5 días y el exantema rosáceo aparece coincidiendo con la desaparición de la fiebre²². Además pueden asociarse síntomas de vías respiratorias superiores o gastrointestinales. Se ha relacionado la infección con convulsiones febriles benignas. Se trata de una infección de muy buen pronóstico que no requiere tratamiento.

Exantemas vesiculoampollosos

Varicela. Es la enfermedad resultante de la primoinfección por el virus varicela-zóster (VVZ), de la familia *Herpesviridae*, que también incluye los virus herpes simple (VHS) 1 y 2. La principal característica biológica de la familia es la capacidad de establecer latencia después de producir la infección primaria; en el caso del VVZ, la latencia se establece en los ganglios de las raíces dorsales; en VHS-1, en el ganglio sensorial del trigémino, y en VHS-2, en el ganglio sensorial lumbosacro. La reactivación de los virus produce herpes zóster, herpes labial y herpes genital, respectivamente²³.

La transmisión de VVZ se produce por 3 vías. La más frecuente es por contacto directo con las vesículas de la piel, aunque también puede tener lugar por vía respiratoria. Además, existe la posibilidad de transmisión vertical en caso de infección aguda durante el embarazo. El virus se replica en el tracto respiratorio superior y se disemina infectando los ganglios linfáticos, el hígado y el bazo principalmente. Se trata de una enfermedad altamente contagiosa cuyo período de contagio comprende desde 1-3 días antes de que aparezcan las lesiones cutáneas hasta que solo aparecen costras.

La varicela es de distribución mundial y su incidencia anual suele coincidir con la tasa de nacimientos de cada país; afecta en un 85-90% a menores de 10 años. En España es una enfermedad de declaración obligatoria. Estudios de seroprevalencia muestran que más del 95% de los mayores de 15 años son inmunes a la varicela²⁴. En la actualidad existe una vacuna disponible, de virus vivos atenuados, de aplicación sistemática en España desde 2016. La pauta es de 2 dosis a los 15 meses, a los 3-4 años y a los 12 años en las personas que refieran no haber pasado la enfermedad (también en pauta con 2 dosis). Se hace así con el objetivo de que todos los adolescentes estén inmunizados al terminar la edad pediátrica²⁵, dado que la enfermedad es más grave en el adulto.

El período de incubación es de 10 a 21 días (media 14-16 días). Comienza con fiebre, malestar general y rechazo de la ingesta. Las

lesiones cutáneas aparecen 24 h después. Inicialmente son pápulas rojas que progresan con rapidez a vesículas no umbilicadas sobre base eritematosa. Posteriormente, las vesículas se ulceran, forman costra y cicatrizan. De forma típica, las lesiones se encuentran en un mismo paciente en diferentes estadios (pápula, vesícula y costra) y son muy pruriginosas. En los pacientes vacunados el exantema es menos aparente.

La complicación más frecuente de la varicela es la sobreinfección bacteriana de piel y tejidos blandos, fundamentalmente por *Staphylococcus* spp. y *Streptococcus pyogenes*. Además se han descrito complicaciones respiratorias (neumonía, otitis) en 1/400 adultos; neurológicas (ataxia, síndrome de Guillain Barré) en 1/1.000 casos, y hematológicas (púrpura de Schönlein Henoch)²⁶. La varicela congénita ocurre en el 2% de embarazos de mujeres que presentan la varicela entre las semanas 8 y 26. Se caracteriza por atrofia de miembros y afectación ocular y del sistema nervioso central. Si la infección materna tiene lugar entre 5 días antes del parto y 2 días después, hasta el 31% de los recién nacidos desarrollan varicela neonatal: un cuadro multivisceral grave que cursa con neumonía, hepatopatía y afectación neurológica y que presenta elevada mortalidad.

Tras la resolución de la varicela, el sistema inmune impide la replicación viral del VVZ, que establece infección latente en los ganglios dorsales. Como consecuencia de un descenso en la inmunidad celular, el virus se puede reactivar y producir las manifestaciones típicas del herpes zóster. El 75% de los casos ocurre en mayores de 45 años y solo un 5% en menores de 15 años. La incidencia de herpes zóster aumenta en los pacientes inmunodeprimidos. Antes de la erupción cutánea, los pacientes refieren dolor e hipersensibilidad localizados a lo largo de un dermatoma concreto (neuritis aguda). Días después aparece —en ese lugar y siempre siguiendo el recorrido del dermatoma— una erupción papulosa que rápidamente progresa a vesículas. Al igual que ocurre en la varicela, estas lesiones evolucionan a costra²⁷. Cuando la afectación tiene lugar en ciertos pares craneales puede dar lugar a síndromes característicos, como es el caso del síndrome de Ramsay Hunt, en el que se afecta el VII par craneal, produciendo parálisis facial y vesículas en el conducto auditivo. Es típica la neuralgia postherpética aproximadamente 1 mes después de la resolución de las lesiones, definida como dolor persistente en la misma región.

Enfermedad boca-mano-pie. Es una enfermedad típica de menores de 10 años (máxima incidencia entre 1 y 3 años) consistente en la aparición de pequeñas úlceras en la mucosa oral seguida de erupción de vesículas con halo eritematoso en manos y pies, y en ocasiones en el área del pañal. Además, puede acompañarse de fiebre y síntomas catarrales leves. Las complicaciones neurológicas o respiratorias son muy raras. En la mayor parte de los casos está provocada por el virus Cocksackie (VCo) A16 y por el Enterovirus (EV) 71; se han producido casos y brotes por VCo A6 y VCo A10, con una frecuencia aumentada de las complicaciones neurológicas y de la mortalidad²⁸. Se transmite por vía fecal-oral o por contacto con el líquido de las ampollas.

Enfermedades exantemáticas virales: diagnóstico de laboratorio

En general, en el momento inicial del cuadro exantemático viral (y durante unos pocos días) el virus puede ser recuperado de la muestra clínica adecuada. Días después comienza la respuesta específica de anticuerpos. Así, se diferencian 2 procedimientos de laboratorio para el diagnóstico: de forma directa, mediante la identificación del agente causal, e indirectamente, mediante la identificación de respuesta serológica específica. Ambas aproximaciones son complementarias y se deben valorar en el contexto clínicoepidemiológico.

Diagnóstico directo

Las enfermedades exantemáticas están causadas por virus de familias muy diferentes, pero comparten similitudes en su patogenia.

En general son infecciones de transmisión aérea o a través de fómites, con entrada por mucosa respiratoria o digestiva, donde se produce replicación local seguida de colonización de ganglios locales y viremia primaria, mediante la cual alcanzan órganos diana donde se amplifica masivamente la carga viral para dar una viremia secundaria y alcanzar la piel donde, por diferentes mecanismos, se producen las lesiones características de los diversos exantemas. En el caso de las arbovirosis (dengue, chikungunya, zika), la entrada se produce directamente al torrente sanguíneo a través de la picadura de un insecto. Finalmente, en la mayoría de los casos, el virus se excreta por diferentes vías (respiratoria, mucosa, fecal, urinaria) desde las que se puede propagar a otras personas. Esta excreción es más o menos prolongada dependiendo de cada virus y de cada vía. Finalmente, los herpesvirus linfotrofos (citomegalovirus [CMV], virus Epstein-Barr [VEB], VHH-6) no suelen eliminarse tras la infección primaria, quedando en estado de latencia y pudiendo protagonizar episodios de reactivación con mayor o menor frecuencia a lo largo de la vida.

Según este esquema, la demostración de la presencia de un virus en una muestra de lesión cutánea o líquido vesicular siempre indicará una relación causal con el exantema, al igual que la demostración de viremia, excepto en el caso de herpesvirus linfotrofos en los que, si el método de detección es suficientemente sensible, podría detectarse virus latente, siendo la serología la única forma de dirimir si se trata de una infección primaria o no. Finalmente, el valor diagnóstico de la detección del virus en una vía de excreción (heces, exudado faríngeo, orina) es elevado para muchos de los virus exantemáticos, aunque se ve igualmente comprometido en el caso de los herpesvirus linfotrofos y de algunos EV que circulan masivamente en la comunidad durante los períodos epidémicos excretándose sin producir síntomas, por lo que el significado de un resultado positivo variará dependiendo del contexto epidemiológico.

En el momento de producirse el exantema los virus suelen ser detectables en torrente sanguíneo por un corto intervalo de tiempo, con excepción del EB19, para el que puede prolongarse varias semanas. El comienzo de la presencia de los virus en las vías de excreción suele coincidir con el final de la viremia y persiste en exudado faríngeo (durante días), en orina (alguna semana) o en heces (varias semanas en el caso de los EV).

Como norma general, ante un cuadro de exantema se aconseja tomar suero, exudado faríngeo y orina lo antes posible²⁹. En general, el rendimiento de las técnicas directas suele reducirse después de los primeros 7 días, excepto en el caso del EB19 en sangre y los EV en heces, y en todo caso siempre se ve complementado por la detección de anticuerpos³⁰. En el caso de los exantemas vesiculares, los exudados de las lesiones frescas suelen contener alta concentración de virus y proporcionan un elevado rendimiento diagnóstico. La detección directa del virus requiere la preservación de su capacidad infectiva y/o de su genoma durante el transporte de la muestra al laboratorio, que debe ser rápido y manteniendo la cadena de frío. Para algunos virus como el VS o el de la rubéola (VR), que son muy lábiles, esto es particularmente crítico.

Hay 3 posibles estrategias para revelar la presencia de un virus exantemático en una muestra clínica: demostrar su capacidad de infectar un cultivo celular (aislamiento viral); a través de su reactividad con anticuerpos específicos marcados (detección de antígenos virales), o mediante la amplificación y detección posterior de un fragmento de su genoma (amplificación genómica). En la tabla 2 se presentan los métodos de diagnóstico directo de virus exantemáticos. La observación directa del virus en la muestra por microscopía electrónica es un método clásico que durante mucho tiempo fue la base del diagnóstico diferencial rápido de viruela y varicela a través del examen directo del líquido vesicular. Una vez erradicada la viruela ha quedado en desuso excepto cuando hay sospecha de exantemas vesiculares causados por otros poxvirus (monkeypox, cowpox, etc.).

El aislamiento de virus es la técnica más clásica en el diagnóstico etiológico directo de exantemas virales. Se basa en la inoculación de

la muestra en una batería de líneas celulares de cultivo que abarquen el espectro de posibles agentes causantes del cuadro. Para el caso de VS y VR, la OMS recomienda el uso de la línea celular Vero/h-SLAM, línea modificada genéticamente para expresar en su membrana el receptor del VS, manteniendo la permisividad para el VR²⁹. El CMV suele aislarse en fibroblastos de pulmón (MRC5, WI-38)³¹, mientras que para el cultivo de EV ha de recurrirse a una batería más variada si se pretende cubrir todo el espectro de tipos³². Algunos VCoX no crecen en cultivo celular, al igual que el VEB y el VHH-6, por lo que el aislamiento no es una técnica factible. Finalmente los VD, zika (VZik) y chikungunya (VChik) requieren instalaciones de nivel de bioseguridad 3 para su cultivo.

El VS, los EV o el CMV producen un efecto citopático muy claro y característico; en todo caso, la identificación habrá de confirmarse por detección de antígenos por inmunofluorescencia (IF). En algunos casos (como CMV, VVZ o VS), el tiempo necesario para observar el efecto citopático puede prolongarse, e incluso es necesario hacer subcultivos antes de emitir un resultado negativo. Esto se puede evitar haciendo IF en las células a los 2 días de la inoculación, mediante *shell-vial*³¹. También puede hacerse directamente sobre células de sedimento urinario (VS), respiratorias (adenovirus [ADV], EV) o leucocitos (CMV) para detectar antígenos por IF, que durante mucho tiempo ha sido la mejor alternativa para el diagnóstico rápido de estas enfermedades, antes de la aparición de las técnicas de amplificación genómica³³.

Para la detección de los ácidos nucleicos de los virus por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en primer lugar hay que liberar y poner en solución los ácidos nucleicos (extracción) empleando métodos que permitan obtener ácidos nucleicos totales, ya que hay virus exantemáticos tanto con ADN (EB19, ADV, herpesvirus) como con ARN (VS, VR, EV, VD, VZik, VChik). Este proceso puede ser automatizado mediante el uso de robots extractores, disponibles comercialmente. A continuación se realiza la reacción de amplificación; con un paso previo de retrotranscripción (RT) si se van a ensayar virus ARN, lo cual puede hacerse en un solo paso mediante el uso de reactivos comerciales de RT-PCR acoplada. Finalmente se detectan los amplificados por electroforesis en gel de agarosa o por hibridación en microplaca. Para obtener una sensibilidad adecuada puede ser necesario recurrir a una reacción adicional de amplificación (PCR anidada o *nested* PCR). En las técnicas de PCR a tiempo real (PCR-tr) la producción de productos de amplificación viene acoplada a la generación de una señal de fluorescencia, que se monitoriza en tiempo real con excelente sensibilidad, evitando el uso de PCR anidada y la manipulación de los productos de amplificación. Además son potencialmente cuantitativas, aunque este aspecto no es de especial interés en el diagnóstico de los exantemas virales. Las técnicas de PCR-tr son rápidas, sencillas y fácilmente automatizables. En consecuencia son las que se han impuesto actualmente, ya que además ofrecen mayor sensibilidad que el aislamiento y la detección de antígenos³³, alargando el intervalo de tiempo durante el cual los virus son detectables en las muestras. La oferta comercial de ensayos de PCR-tr todavía es escasa para los virus exantemáticos más importantes, pero está en clara expansión y hay disponibles protocolos para los agentes más importantes³⁴⁻³⁸. Finalmente, la PCR permite diseños múltiples en los que se pueden ensayar varios agentes de manera simultánea generando fragmentos de amplificación de tamaños lo suficientemente diferentes como para diferenciarlos por electroforesis³⁹. Hay métodos disponibles para detección simultánea de VS, VR y EB19³⁹, o de EV y VVZ⁴⁰. La PCR-tr permite también esta posibilidad empleando sondas marcadas con diferentes fluoróforos, por lo que actualmente hay un activo desarrollo de técnicas múltiples de PCR-tr⁴¹⁻⁴³ de las que en breve habrá disponibilidad comercial y que se consideran el futuro del diagnóstico. En el diseño de las PCR (tanto convencionales como PCR-tr) es fundamental elegir zonas del genoma que permitan identificar todas las especies (p. ej., VHH-6A y VHH-6B) y genotipos existentes de los virus a ensayar, relacionados con los cuadros clíni-

cos, para lo cual es necesario asegurar que el diseño sigue siendo vigente conforme las cepas de los virus van evolucionando o adaptarlo a medida que aparecen nuevos genotipos.

Diagnóstico serológico

Es una aproximación alternativa y complementaria a los métodos directos. A los pocos días del comienzo de la enfermedad se empieza a producir la respuesta específica de anticuerpos, que en un primer momento es del tipo IgM (que dura alrededor de 2-3 meses), y que va seguida de la respuesta IgG, que alcanza el máximo a los 15-20 días, y que son de larga duración. Así, la detección de IgM es el método más adecuado para hacer el diagnóstico. Sin embargo, si la muestra está tomada cerca del comienzo de los síntomas, puede no ser detectable; por lo que se precisa de una muestra de seguimiento, tomada 10 días después para confirmar la infección mediante seroconversión de IgG o de anticuerpos totales. Los métodos en fase sólida permiten detectar anticuerpos específicos del isotipo IgM (para diagnóstico de infección reciente), o IgG (para determinar inmunidad o seroconversión), en tanto que las técnicas que miden anticuerpos totales son útiles fundamentalmente para confirmar la seroconversión. En la tabla 2 se relacionan los virus exantemáticos para cuyo diagnóstico son de aplicación los métodos serológicos.

Entre las enfermedades exantemáticas, se reconoce la utilidad de la detección de IgM en el diagnóstico de VS, VR, EB19, CMV, VEB y los arbovirus VD, VZik y VChik⁴⁴ (tabla 2). En general, la respuesta IgM es detectable entre los 3-5 días desde la aparición del exantema, aunque excepcionalmente se puede retrasar (tal es el caso de crisis aplásicas transitorias por EB19); de esta manera, el criterio diagnóstico de elección es la detección de IgM específica en muestra aguda. En el caso de que la primera muestra disponible haya sido tomada en los primeros días, con resultado IgM negativo, y no se disponga de muestra para detección directa, o muestre resultado negativo, se requiere otro suero tomado 7-10 días después, para evidenciar seroconversión de IgM y/o IgG.

Sin embargo, la determinación de IgM no está exenta de problemas, pudiendo obtenerse resultados positivos falsos, por la presencia simultánea de factor reumatoide e IgG específica⁴⁵; por las reacciones cruzadas entre virus, especialmente cuando producen patologías similares (VEB y CMV, por ejemplo)⁴⁶, o por la estimulación policlo-

Tabla 2

Métodos de laboratorio para el diagnóstico de exantemas virales

Virus	Aislamiento	Detección de antígenos	PCR	Serología
Sarampión	+	NA	+++	+++
Rubéola	+	NA	+++	+++
Erythrovirus B19	NA	NA	+++	+++
Enterovirus	+ / +++	+	+++	+
Herpes humano 6	NA	NA	+++	++
Varicela-zóster	+	+	+++	++
Herpes simple	+	+	+++	++
Epstein-Barr	NA	NA	+++	+++
CMV	+	++	+++	+++
Dengue	NA	+++	+++	++
Zika	NA	NA	+++	++
Chikungunya	NA	NA	+++	+++

NA: no aplicable.

nal de linfocitos de memoria que origina respuesta IgM en pacientes que son IgG positivos, en ausencia de infección reciente⁴⁷. Por otra parte, hay presencia de IgM tanto en infección primaria como en secundaria y su discriminación es importante. Igualmente, infecciones recientes pueden cursar sin desarrollo de IgM: como las infecciones en inmunodeprimidos. Por último, hay situaciones de persistencia de IgM durante prolongados intervalos de tiempo que pueden dificultar el diagnóstico. Todas estas circunstancias son problemáticas cuando se plantea hacer el diagnóstico diferencial de enfermedad exantemática (rubéola, sarampión y EB19⁴⁸) y se requieren métodos confirmatorios. Los ensayos de avidez de IgG permiten confirmar la infección primaria. Son de aplicación para caracterizar casos de sarampión con fallo vacunal⁴⁹ y para confirmar los casos de infección primaria por rubéola, especialmente en el embarazo⁵⁰, en el contexto del Plan de Eliminación de estas enfermedades, así como para la caracterización de casos por VEB⁵¹ y CMV⁵². El establecimiento de perfiles de anticuerpos frente al VEB permite confirmar la infección por este virus en presencia de reactividad frente a otros herpesvirus. La cuantificación de anticuerpos totales o de IgG en muestra aguda permite establecer con alta probabilidad una infección secundaria (caso del zóster). El establecimiento de la ratio IgM/IgG permite diferenciar la infección primaria y secundaria por VD. Por último, hay circunstancias en las que la caracterización serológica específica solo se puede hacer de forma definitiva mediante neutralización (VD y VZik, EV y ADV).

Enfermedades exantemáticas virales: caracterización molecular

La caracterización genética de los virus exantemáticos es de especial trascendencia en los casos de sarampión y rubéola por tratarse de enfermedades en proceso de eliminación. La caracterización genética de otros virus exantemáticos será más relevante conforme se progrese en la eliminación del sarampión y la rubéola para mejorar los procesos de vigilancia.

La caracterización genética de los virus es una herramienta fundamental en la vigilancia del sarampión y la rubéola. Resulta indispensable para diagnosticar con certeza los casos posvacunales; trazar los patrones de circulación de las cepas; identificar el origen importado o autóctono de un caso, y describir la ausencia de circulación endémica para documentar la eliminación en una región determinada. Estas técnicas se basan en la amplificación mediante RT-PCR, secuenciación y posterior análisis filogenético de regiones variables del genoma de estos virus. El genotipado solo puede realizarse sobre muestras en las que se haya detectado el virus por aislamiento o RT-PCR.

Nomenclatura asignada por la Organización Mundial de la Salud

La nomenclatura se ha uniformizado con el fin de armonizar la que se utiliza para todos los componentes de la vacuna triple viral (p. ej., MVs/Madrid.ESP/24.15/)⁵³.

Genotipado de los casos

En el VS, la región mínima para asignar genotipo son los 450 nucleótidos (nt) que codifican el extremo carboxilo de la nucleoproteína (N-450). Además de esta, se debe utilizar al menos la secuencia de la región codificante completa del gen *H*, para la descripción de un nuevo genotipo. Así, se han definido 24 genotipos (A, B1-B3, C1, C2, D1-D11, E, F, G1-G3, H1 y H2), pertenecientes a 8 grupos filogenéticos (A-H), con una secuencia de referencia para cada uno^{53,54}. No todos los genotipos se encuentran en circulación en la actualidad, siendo relevantes en Europa los genotipos D8 y B3.

En el caso de VR, el genotipado se basa en una secuencia de 739 nt (del nt 8731 al nt 9469) de la región codificante del gen *E1*. Además, para describir un nuevo genotipo se necesita la secuencia com-

pleta de la región del genoma que codifica las proteínas estructurales (3192 nt) de 2 cepas de referencia para cada genotipo. Así se han definido 12 genotipos (1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G, 1H, 1I, 1J, 2A, 2B, 2C) y uno provisional (1a), pertenecientes a 2 grupos filogenéticos⁵⁵. En la actualidad en Europa circula fundamentalmente el genotipo 2B.

Para llevar a cabo el genotipado se realiza un análisis filogenético en el que se incluye la secuencia problema y las secuencias de referencia referidas anteriormente, recomendadas por la OMS para cada virus.

Bases de datos MeaNS y RubeNS

En 2008, la red de laboratorios de referencia para sarampión y rubéola de la OMS creó la base de datos Measles Nucleotide Surveillance (MeaNS)⁵⁶, principalmente de secuencias N-450, enviadas por los laboratorios de la red. Además incluye la información necesaria para obtener el nombre asignado por la OMS y datos epidemiológicos adicionales. MeaNS proporciona además herramientas para el genotipado y la comparación de secuencias. Existe una base de datos similar para la rubéola denominada RubeNS⁵⁵, aunque la disponibilidad de secuencias es menor y el uso en tiempo real muy escaso actualmente. Compartir lo antes posible la información genética de las cepas que circulan a través de estas bases de datos constituye una herramienta fundamental para la vigilancia del sarampión y la rubéola.

Nuevas herramientas de caracterización molecular al servicio de la vigilancia epidemiológica del sarampión y la rubéola

En la actualidad el genotipado es un método valioso pero insuficiente para la vigilancia. En el caso del sarampión, en los últimos años se han producido grandes brotes por un mismo genotipo, sin que este dato por sí solo permita establecer los patrones de circulación del virus. Sin embargo, MeaNS permite un estudio más detallado de las secuencias N-450 del mismo genotipo, discriminando unas de otras y aportando más información. El conjunto de secuencias idénticas de un mismo genotipo se denomina *haplotipo* y se designa con el nombre de la más antigua. Cuando un haplotipo ha sufrido una amplia distribución, tanto temporal como geográfica, es reconocido por MeaNS con rango de variante de secuencia o *named strain*⁵⁴. Desde la OMS se insta a los laboratorios de referencia a identificar las variantes de los casos que se producen en su país y aportar estos datos, así como el nombre de la OMS de cada caso y la identificación de la muestra en MeaNS, a través de informes anuales. En España esta metodología ya está disponible para la vigilancia.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Instituto de Salud Carlos III. Plan de Eliminación del Sarampión en España, 2000. Disponible en: <http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=19/10/2012-f2327d5909>
2. Griffin DE. Measles Virus. En: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. Vol 2. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams and Wilkins; 2013. p. 1042-69.
3. Marcadante K, Kliegman R, Jenson H, Behrman R. Infecciones relacionadas con exantemas. En: Nelson Pediatría Esencial. 6.ª ed. Barcelona: Elsevier Saunders; 2011. p. 367.
4. World Health Organization. Eliminating measles and rubella and preventing congenital rubella infection: WHO European Region Strategic Plan 2005-2010. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2005.
5. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Protocolos de enfermedades de declaración obligatoria. Madrid, 2013.
6. Masa J, López N, De Viarce M. Vigilancia epidemiológica en España del sarampión, la rubéola y el síndrome de rubéola congénita. *Rev Esp Salud Pública*. 2015;89:365-79.

7. World Health Organization. Measles. Fact sheet [updated July 2017] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs286/en/>
8. 4th Meeting of the European Regional Verification Commission for Measles and Rubella Elimination (RVC). Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2016. Disponible en: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0011/304958/4th-RVC-meeting-report.pdf
9. Centro Nacional de Epidemiología. Plan Nacional de Eliminación del Sarampión y de la Rubéola. Informe anual 2011. Disponible en: <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/fd-enfermedades-prevenibles-vacunacion/Informe-Anual-Plan-Eliminacion-Sarampion-Rubeola-2011.pdf>
10. Centro Nacional de Epidemiología. Plan Nacional de Eliminación del Sarampión y de la Rubéola. Informe anual 2012. Disponible en: http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/fd-enfermedades-prevenibles-vacunacion/Informe-Sarampion_Rubeola-y-SRC_Espana-2012.pdf
11. Centro Nacional de Epidemiología. Plan Nacional de Eliminación del Sarampión y de la Rubéola. Informe anual 2015. Disponible en: http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/fd-enfermedades-prevenibles-vacunacion/pdf_2016/Vigilancia_SAR_RUB_2015web.pdf
12. Perry RT, Halsey NA. The clinical significance of measles: a review. *J Infect Dis.* 2004;189 Suppl 1:S4-16.
13. Atkinson W, Wolfe C, Hamborsky J, editors. *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases (The Pink Book)*. 12th ed. Washington DC: The Public Health Foundation; 2011.
14. Moulin E, Beal V, Jeantet D, Horvat B, Wild TF, Waku-Kouomou D. Molecular characterization of measles virus strains causing subacute sclerosing panencephalitis in France in 1977 and 2007. *J Med Virol.* 2011;83:1614-23.
15. Lambert N, Strebel P, Orenstein W, Icenogle J, Poland GA. Rubella. *Lancet.* 2015;385:2297-307.
16. Muscat M, Ben Mamou M, Shefer A, Jankovic D, Deshevoy S, Butler R. The state of measles and rubella in the WHO European region. *Rev Esp Salud Publica.* 2015;89:345-51.
17. Lazar M, Abernathy E, Chen MH, Icenogle J, Janta D, Stanescu A, et al. Epidemiological and molecular investigation of a rubella outbreak, Romania, 2011 to 2012. *Euro Surveill.* 2016;21:30345.
18. Cherry JD. Rubella virus. In: Feigin RD, Cherry JD, Demmler-Harrison GJ, Kaplan SL, editors. *Feigin and Cherry's Textbook of Pediatric Infectious Diseases*. 6th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2009. p. 2271-99.
19. Salvia MD, Álvarez E, Bosch J, Goncé A. Infecciones congénitas. *Protocolos Diagnóstico Terapéuticos de la AEP: Neonatología*. Barcelona: Asociación Española de Pediatría; 2008.
20. Qiu J, Söderlund-Venermo M, Young NS. Human Parvoviruses. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30:43-113.
21. Vargas-Díez E, Buezo GF, Aragües M, Daudén E, De Ory F. Papular purpuric gloves and socks syndrome. *Int J Dermatol.* 1996;35:626-32.
22. Agut H, Bonnafous P, Gautheret-Dejean A. Laboratory and Clinical Aspects of Human Herpesvirus 6 Infections. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28:313-35.
23. Gershon AA, Gershon MD. Pathogenesis and Current Approaches to Control of Varicella-Zoster Virus Infections. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26:728-43.
24. Nardone A, De Ory F, Carton M, Cohen D, Van Damme P, Davidkin I, et al. The comparative sero-epidemiology of varicella zoster virus in 11 countries in the European region. *Vaccine.* 2007;25:7866-72.
25. Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud. MSSSI. Calendario común de vacunación infantil recomendado para 2016. Disponible en: <http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/proteccionSalud/vacunaciones/docs/CalendarioVacunacion2016.pdf>
26. Gnann JW Jr. Varicella-zoster virus: atypical presentations and unusual complications. *J Infect Dis.* 2002;186 Suppl 1:S91-8.
27. Dworkin RH, Johnson RW, Breuer J, Gnann JW, Levin MJ, Backonja M, et al. Recommendations for the management of herpes zoster. *Clin Infect Dis.* 2007;44 Suppl 1: S1-26.
28. Aswathyraj S, Arunkumar G, Alidjinou EK, Hober D. Hand, foot and mouth disease (HFMD): emerging epidemiology and the need for a vaccine strategy. *Med Microbiol Immunol.* 2016;205:397-407.
29. Organización Mundial de la Salud. Manual para el diagnóstico de laboratorio de la infección por los virus del sarampión y de la rubéola. 2.ª ed. 2007. Disponible en: http://www.who.int/ihr/elibrary/manual_diagn_lab_mea_rub_sp.pdf
30. Mosquera MM, De Ory F, Gallardo V, Cuenca L, Morales M, Sánchez-Yedra W, et al. Evaluation of diagnostic markers for measles virus infection in the context of an outbreak in Spain. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5117-21.
31. Gimeno Cardona C, Navarro Ortega D, De Oña Navarro M, Pérez Sáenz JL. Diagnóstico Microbiológico de las Infecciones por Herpesvirus. 8a. En: Cercenado E, Cantón R, editores. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Madrid: SEIMC; 2005.
32. Prats G, Codina MG, Cueto M, Echevarría JE, Vicente D. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del sistema nervioso central. 36. En: Cercenado E, Cantón R, editores. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Madrid: SEIMC; 2010.
33. Chua KY, Thapa K, Yapa CM, Somerville LK, Chen SC, Dwyer DE, et al. What assay is optimal for the diagnosis of measles virus infection? An evaluation of the performance of a measles virus real-time reverse transcriptase PCR using the Cepheid SmartCycler® and antigen detection by immunofluorescence. *J Clin Virol.* 2015;70:46-52.
34. Akiyama M, Kimura H, Tsukagoshi H, Taira K, Mizuta K, Saitoh M, et al. Development of an assay for the detection and quantification of the measles virus nucleoprotein (N) gene using real-time reverse transcriptase PCR. *J Med Microbiol.* 2009;58:638-43.
35. Pillet S, Billaud G, Omar S, Lina B, Pozzetto B, Schuffenecker I. Multicenter evaluation of the Enterovirus R-gene real-time RT-PCR assay for the detection of enteroviruses in clinical specimens. *J Clin Virol.* 2009;46 Suppl 1:S1-14.
36. Takano T, Yamada K. Quantitation of human parvovirus B19 DNA by real-time polymerase chain reaction. *Pediatr Int.* 2007;49:459-62.
37. Thomas B, Beard S, Jin L, Brown KE, Brown DW. Development and evaluation of a real-time PCR assay for rapid identification and semi-quantitation of measles virus. *J Med Virol.* 2007;79:1587-92.
38. Zhao LH, Ma YY, Wang H, Zhao SP, Zhao WM, Li H, et al. Establishment and application of a TaqMan real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assay for rubella virus RNA. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2006;38:731-6.
39. Mosquera MM, De Ory F, Moreno M, Echevarría JE. Simultaneous detection of measles virus, rubella virus, and parvovirus B19 by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2002;40:111-6. Erratum in: *J Clin Microbiol.* 2002;40:1574.
40. Casas I, Pozo F, Trallero G, Echevarría JM, Tenorio A. Viral diagnosis of neurological infection by RT multiplex PCR: a search for entero- and herpesviruses in a prospective study. *J Med Virol.* 1999;57:145-51.
41. Hübschen JM, Kremer JR, De Landtsheer S, Muller CP. A multiplex TaqMan PCR assay for the detection of measles and rubella virus. *J Virol Methods.* 2008;149:246-50.
42. Naze F, Le Roux K, Schuffenecker I, Zeller H, Staikowsky F, Grivard P, et al. Simultaneous detection and quantitation of Chikungunya, dengue and West Nile viruses by multiplex RT-PCR assays and dengue virus typing using high resolution melting. *J Virol Methods.* 2009;162:1-7.
43. Wada K, Mizoguchi S, Ito Y, Kawada J, Yamauchi Y, Morishima T, et al. Multiplex real-time PCR for the simultaneous detection of herpes simplex virus, human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7. *Microbiol Immunol.* 2009;53:22-9.
44. Landry ML. Immunoglobulin M for Acute Infection: True or False? *Clin Vaccine Immunol.* 2016;23:540-5.
45. Meurman OH, Ziola BR. IgM-class rheumatoid factor interference in the solid-phase radioimmunoassay of rubella-specific IgM antibodies. *J Clin Pathol.* 1978; 31:483-7.
46. Kinno R, Kurokawa S, Uchiyama M, Sakae Y, Kasai H, Ogata H, et al. False-positive results obtained for immunoglobulin M antibody tests of cerebrospinal fluid for herpes simplex virus in a patient with varicella zoster virus encephalitis. *Intern Med.* 2015;54:2667-70.
47. Sakiani S, Koh C, Heller T. Understanding the presence of false positive antibodies in acute hepatitis. *J Infect Dis.* 2014;10:1886-9.
48. Thomas HJ, Barrett E, Hesketh LM, Wynne A, Morgan-Capner P. Simultaneous IgM reactivity by EIA against more than one virus in measles, parvovirus B19 and rubella infection. *J Clin Virol.* 1999;14:107-18.
49. Mercader S, García P, Bellini WJ. Measles virus IgG avidity assay for use in classification of measles vaccine failure in measles elimination settings. *Clin Vaccine Immunol.* 2012;19:1810-7.
50. Tipples GA. Rubella diagnostic issues in Canada. *J Infect Dis.* 2011;204 Suppl 2: S659-63.
51. De Ory F, Antonaya J, Fernández MV, Echevarría JM. Application of low avidity immunoglobulin G studies to diagnosis of Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *J Clin Microbiol.* 1993;31:1669-71.
52. Guisasaola ME, Ramos B, Sanz JC, García-Bermejo I, De Ory Manchón F. Comparison of IgG avidity assays in the confirmation of the diagnosis of cytomegalovirus primary infection. *APMIS.* 2010;118:991-3.
53. World Health Organization. Measles virus nomenclature update: 2012. *Wkly Epidemiol Rec.* 2012;87:73-80.
54. World Health Organization. Genetic diversity of wild-type measles viruses and the global measles nucleotide surveillance database (MeaNS). *Wkly Epidemiol Rec.* 2015;90:373-80.
55. World Health Organization. Rubella virus nomenclature update: 2013. *Wkly Epidemiol Rec.* 2013;88:337-48.
56. Rota PA, Brown K, Mankertz A, Santibanez S, Shulga S, Muller CP, et al. Global distribution of measles genotypes and measles molecular epidemiology. *J Infect Dis.* 2011;204 Suppl 1:S514-23.