

Directrices de laboratorio para la detección y el diagnóstico de la infección por el virus de mpox

27 de agosto de 2024

Este documento es una actualización de las Directrices de laboratorio para la detección y el diagnóstico de la infección por el virus de mpox publicadas por la Organización Panamericana de la Salud el 15 de agosto de 2024. El documento se modificó para incluir la recomendación más reciente sobre el envío de muestras clínicas de casos sospechosos o confirmados de mpox.

Este documento está basado en la guía provisional de la Organización Mundial de la Salud sobre las pruebas de laboratorio para el virus de mpox, 10 de mayo de 2024, y tiene por objeto proporcionar orientación a los Laboratorios Nacionales de Referencia sobre la detección de este virus.

Monkeypoxvirus (MPXV) es un virus ADN de doble cadena, miembro del género *Orthopoxvirus* dentro de la familia *Poxviridae*. Los poxvirus son causantes de enfermedades en humanos y en muchos otros animales; la infección generalmente resulta en la formación de lesiones, nódulos de la piel o erupción diseminada. Otras especies patógenas para los humanos incluyen el virus de la *viruela bovina* y el virus de la *variola* (que causa la viruela, que ha sido erradicada). El virus *Vaccinia* es también un OPXV que se ha utilizado como una vacuna atenuada y fue una herramienta clave para la erradicación de la viruela lograda en 1980. Todos los *orthopoxvirus* (OPXV) están relacionados antigénicamente.

MPXV recibe su nombre debido a la detección inicial en colonias de monos, aunque se puede encontrar principalmente en roedores; sin embargo, el reservorio específico no se ha determinado. Adicionalmente, existen dos grupos genéticos (*clados*) de MPXV ahora denominados Clado I (antiguo Clado de la cuenca del Congo) y Clado II (antiguo clado de África Occidental). El Clado II consta de dos subclados, IIa y IIb. El brote 2022/2023 que acometió varios países se asoció con la propagación de un virus del clado IIb, y fue reconocido como una emergencia de salud pública de importancia internacional (ESPII) desde el 23 de julio de 2022 hasta el 11 de mayo de 2023. El clado IIb continúa circulando en todo el mundo, y hasta la fecha es el único detectado en las Américas.

En diciembre de 2022, la República Democrática del Congo (RDC) declaró un brote nacional de mpox y, desde septiembre de 2023, el brote que afectó a la provincia de Kivu del Sur se ha extendido y ha afectado a otras provincias de la RDC. Además, en el último mes, cuatro nuevos países de África oriental (Burundi, Kenia, Ruanda y Uganda) notificaron sus primeros casos de mpox. Todos los casos secuenciados hasta la fecha en África oriental y central pertenecen a un nuevo subclado del clado I, clado Ib. Por otra parte, Côte d'Ivoire está experimentando un brote de mpox vinculado al clado II MPXV y Sudáfrica ha notificado otros dos casos confirmados. El 14 de agosto de 2024, se determinó que el recrudecimiento de mpox en la RDC y otros países de África constituía una ESPII. El 15 de agosto de 2024 se detectó en Suecia el primer caso de clado I fuera de la región de África

Después de una incubación que puede ir de 6 a 16 días, la presentación típica de mpox inicia con un corto período prodrómico febril, seguido del desarrollo progresivo de una erupción clásica con lesiones induradas y umbilicadas (deprimidas centralmente), comenzando en la cabeza o la cara y progresando hasta las extremidades y el tronco. Las lesiones progresan todas en la misma etapa, desde máculas, pápulas, vesículas, pústulas y, finalmente, costras que se secan y se caen después de dos a cuatro semanas. A menudo hay enantema (llagas o úlceras en mucosas) en la boca y las lesiones pueden afectar los ojos y / o el área genital.

Debido a la variedad de afecciones que causan erupciones cutáneas y debido a que la presentación clínica puede ser más atípica en este brote, puede ser difícil diferenciar mpox únicamente en función de la presentación clínica. Por lo tanto, la decisión de realizar una prueba de laboratorio debe basarse en factores clínicos y epidemiológicos, vinculados a una evaluación de la probabilidad de infección. A cualquier persona que cumpla con la definición de un caso sospechoso se le debe ofrecer una prueba.

Dada la detección actual de MXP en múltiples países, se debe realizar pruebas a cualquier caso que cumpla con la definición de caso sospechoso. En este sentido, la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS) recomienda a los Estados Miembros asegurar la identificación oportuna de los casos sospechosos, la recolección de muestras, y la implementación de protocolos de detección molecular, en los Laboratorios Nacionales de Referencia, de acuerdo con la capacidad existente. Cuando sea necesario, el envío de muestras a Laboratorio de Referencia a nivel regional o global debe ser considerado. Por favor contactar a la Oficina Regional de OPS para asesoramiento en los procedimientos.

TOMA Y GESTION DE MUESTRAS

Procedimientos de bioseguridad

Se debe garantizar el uso de procedimientos operativos estándar (POE) apropiados, y el personal de laboratorio debe estar capacitado para el uso adecuado del equipo de protección personal (EPP), incluyendo bata desechable antifluido, guantes de látex, gafas o cubierta facial completa, gorro, protección respiratoria y cubrecalzado, así como para la eliminación posterior del mismo. Adicionalmente, el personal debe estar entrenado para la recolección, el almacenamiento, el embalaje y el transporte de muestras.

Gestión de riesgo biológico

Se deben tomar medidas para minimizar el riesgo de transmisión de laboratorio, con base en una **evaluación del riesgo a nivel institucional**, para analizar muestras clínicas de rutina de pacientes sospechosos o confirmados de mpox. Estos pueden incluir entre otros, definir un número limitado de personal de laboratorio que procesen muestras, con experiencia y competencia comprobada, usar el EPP apropiado, usar precauciones estándar aplicadas rigurosamente y evitar cualquier procedimiento que pueda generar aerosoles infecciosos.

Los desinfectantes efectivos incluyen compuestos de amonio cuaternario al 0,5% (o 200 ppm) o desinfectantes a base de cloro (0,5%). Se debe garantizar el cumplimiento riguroso de las pautas de prevención y control de infecciones durante la recolección y manipulación de muestras (se está desarrollando la guía de manejo clínico y de prevención y control de infecciones)

Se recomienda que todas las manipulaciones de especímenes procedentes de casos sospechosos, probables o confirmados de mpox en el laboratorio se realicen de acuerdo con un enfoque basado en el riesgo. Cada laboratorio debe realizar una evaluación de riesgos local (es decir, institucional).

Al manipular especímenes biológicos en el laboratorio, deben cumplirse los requisitos básicos de un ambiente de bioseguridad nivel 2, y deben aplicarse medidas de control reforzadas basadas en la evaluación local del riesgo.

Una infección por MPXV puede ocurrir en el laboratorio por vía respiratoria durante la etapa de procesamiento de muestras a partir de material contaminado o por prácticas inadecuadas. Por lo tanto, se recomiendan medidas de bioseguridad reforzadas además de los requisitos básicos, incluidos los siguientes, para ensayos diagnósticos sin propagación del virus:

- Las muestras de pacientes con sospecha de infección por MPXV deben manipularse en una cabina de bioseguridad de Clase II revisada (según manual de mantenimiento de laboratorio, OPS), o certificada, antes de la inactivación de la muestra. Las muestras debidamente inactivadas no requieren cabina de bioseguridad.
- El personal de laboratorio debe usar el EPP adecuado, especialmente para manipular las muestras antes de la inactivación.
- Cuando se requiera el uso de una centrifuga para un procedimiento, se deben usar recipientes de seguridad o rotores sellados.

Deben considerarse medidas de control adicionales para procedimientos específicos, incluidos los procedimientos de formación de aerosoles, de acuerdo con la evaluación local del riesgo. Para obtener más información sobre los requisitos básicos de bioseguridad y las medidas de control reforzadas, consulte la cuarta edición del Manual de Bioseguridad de la OMS.

Tipos de muestras

El tipo de muestra recomendada para la confirmación de laboratorio de mpox es el material de la lesión cutánea, que incluye:

- Hisopado de la superficie y/o del exudado de la lesión,
- Bordes superiores de más de una lesión (superficie de las lesiones), o
- Costras de lesiones.

Los hisopados de lesiones, costras y fluidos vesiculares no deben mezclarse en el mismo tubo.

Después de limpiar cuidadosamente con solución salina o PBS estéril, se debe frotar vigorosamente la lesión para garantizar que se recolecte suficiente material para la obtención del ADN viral. No hay necesidad de quitar los bordes superiores o de perforar las lesiones antes de frotar. Los hisopados se pueden coleccionar en tubos secos o en tubos con medios de transporte viral (VTM). Aunque la toma de hisopos de lesiones suele ser suficiente para la prueba, la toma de bordes superiores o costras puede ser útil, especialmente si la progresión del caso es avanzada. En este caso, se deben seguir estrictamente las medidas de prevención de lesiones por cortopunzantes. Dos lesiones del mismo tipo deben recogerse en un solo tubo, preferiblemente de diferentes lugares del cuerpo y que difieren en apariencia.

Además de una muestra de lesión, se recomienda la recolección de un hisopado orofaríngeo. Sin embargo, los datos sobre la utilidad de este tipo de muestra para el diagnóstico de mpox son limitados, por lo tanto, una muestra de hisopado de garganta negativa debe interpretarse con precaución.

Debido a que el brote actual aún está bajo investigación, la recolección de otros tipos de especímenes adicionales con fines de investigación puede considerarse si lo permite la junta de revisión ética apropiada, y hay suficiente experiencia médica y de laboratorio para su recolección, manejo y almacenamiento seguros. Estos pueden incluir orina, semen, hisopado rectal y / o genital en indicación basada en la presentación clínica, incluida la ubicación de las lesiones.

Almacenamiento de muestras

Las muestras s deben refrigerarse (2 a 8 °C) o congelarse (-20 °C o menos) durante el lapso de una hora después de la recolección. Si el transporte excede los 7 días para que la muestra se analice, las muestras deben almacenarse a -20 ° C o menos.

Se recomienda el almacenamiento de muestras a largo plazo (>60 días desde la recolección) a -70 ° C. Se deben evitar los ciclos repetidos de congelación-descongelación porque pueden reducir la calidad de los especímenes.

Otros tipos de muestra

El tipo de muestra adicional (no destinada al diagnóstico de rutina y no es necesario recolectarlas fuera de los entornos de investigación) son (1) sangre en EDTA que se puede usar para apoyar la detección de MPXV, pero puede no contener un alto nivel de virus como el que se encuentra en las muestras de lesiones, ya que cualquier viremia ocurre temprano en el curso de la infección, generalmente en el período prodrómico, y antes de que las lesiones cutáneas se manifiesten; (2) biopsia de la lesión durante la etapa macular que debe considerarse solo si está clínicamente indicada y solo debe ser realizada por personal con la capacitación adecuada.

ENVÍO DE MUESTRAS

Las muestras deben almacenarse refrigeradas o congeladas dentro del lapso de una hora de la recolección, y transportarse al laboratorio tan pronto como sea posible después de la recolección. El manejo y almacenamiento correctos de las muestras durante el transporte es esencial para realizar un diagnóstico preciso.

El transporte de especímenes debe cumplir con la normativa nacional y/o internacional aplicable, incluida la Modelo de Reglamentación de las Naciones Unidas sobre Recomendaciones para el transporte de sustancias peligrosas y otras normativas aplicables en función del modo de transporte que se utilice.

Para el transporte internacional, las muestras clínicas de casos sospechosos o confirmados de mpox pueden enviarse como “Categoría B, Sustancia biológica – UN3373”.

Los cultivos virales deben transportarse como “Categoría A, Sustancia infecciosa que afecta a los seres humanos – UN2814” (no se recomienda intentar el aislamiento viral).

Todos los especímenes que se transporten deben contar con un sistema de triple embalaje, etiquetado y documentación adecuados. El envío aéreo requiere un remitente certificado de mercancías peligrosas. Consulte la Guía de la OMS sobre regulaciones para el transporte de sustancias infecciosas 2023-2024 (disponible solo en inglés en: <https://www.who.int/publications/i/item/789240089525>) para obtener información sobre los requisitos de envío de sustancias infecciosas.

Para envíos internacionales por favor comuníquese con el Grupo de Respuesta de Laboratorio de la OPS a través del mail ricoj@paho.org y/o laboratoryresponse@paho.org

PRUEBAS DE LABORATORIO

Las pruebas para detectar la presencia de MPXV deben realizarse en laboratorios debidamente equipados por personal capacitado en los procedimientos técnicos y de bioseguridad pertinentes. Se deben tomar medidas para minimizar el riesgo de transmisión en el laboratorio en base a la evaluación de riesgo al analizar muestras clínicas de rutina de pacientes confirmados o sospechosos de mpox.

NO SE RECOMIENDA HACER AISLAMIENTO VIRAL EN CULTIVO

Los países sin protocolo de diagnóstico molecular implementado para la detección de MPXV deben enviar muestras clínicas sospechosas (definición de caso estrictamente ajustada) a un laboratorio de referencia designado por la OPS. Para obtener asistencia, comuníquese con el Equipo de Respuesta de Laboratorio de la OPS (ricoj@paho.org).

Ensayos moleculares

La confirmación de la infección por MPXV se basa en pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT), utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional o en tiempo real, para la detección de secuencias específicas de ADN viral. La PCR se puede usar sola o en combinación con la secuenciación de acuerdo con los algoritmos sugeridos.

Extracción de DNA

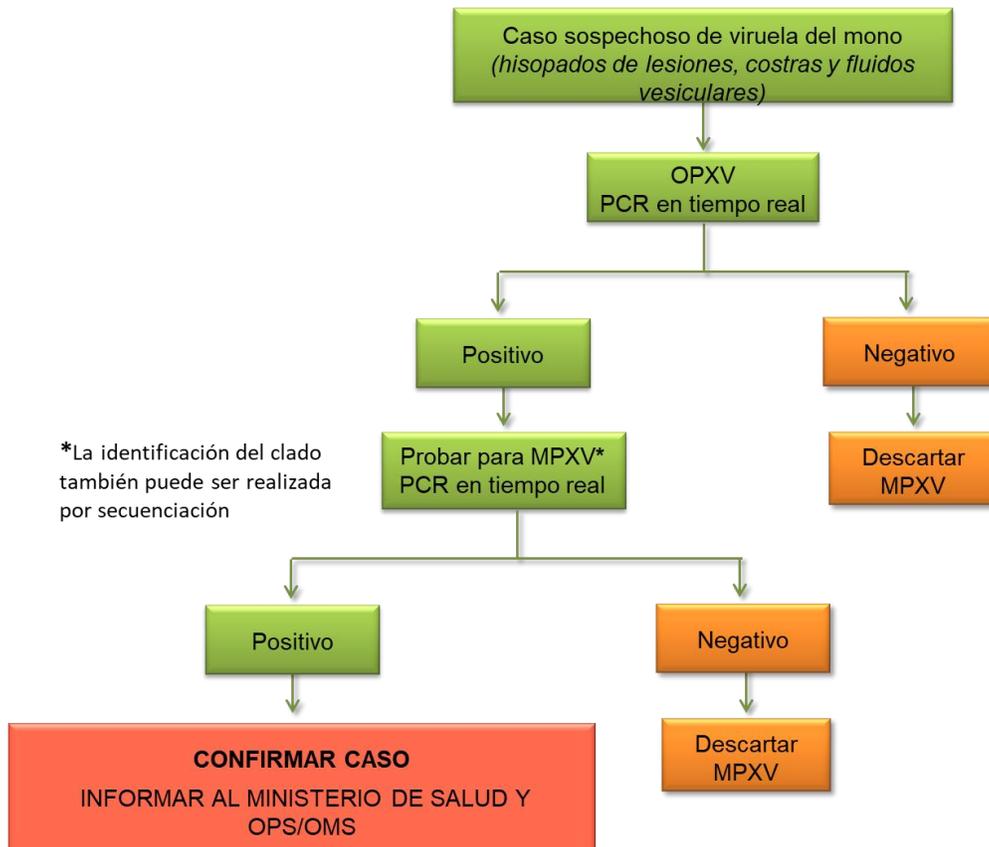
El DNA puede ser extraído a partir de las muestras mencionadas anteriormente utilizando cualquier protocolo de extracción estándar o kit. En general, el paso de lisis en la extracción de DNA inactiva cualquier virus vivo. Por este motivo, se recomienda que el paso de lisis se realice dentro de una cabina de bioseguridad. Para muestras de costras de lesiones el kit de extracción de DNA para muestras de tejido debe ser utilizado para asegurar la lisis apropiada de la muestra.

Protocolos de PCR

Diversos grupos han desarrollado protocolos de PCR para la detección de ORXV o MPXV, así como protocolos para diferenciar y especificar la confirmación de los clados I y II de MPXV. Dependiendo del protocolo disponible, dos algoritmos pueden ser utilizados para la búsqueda del virus y la detección específica.

Algoritmo 1

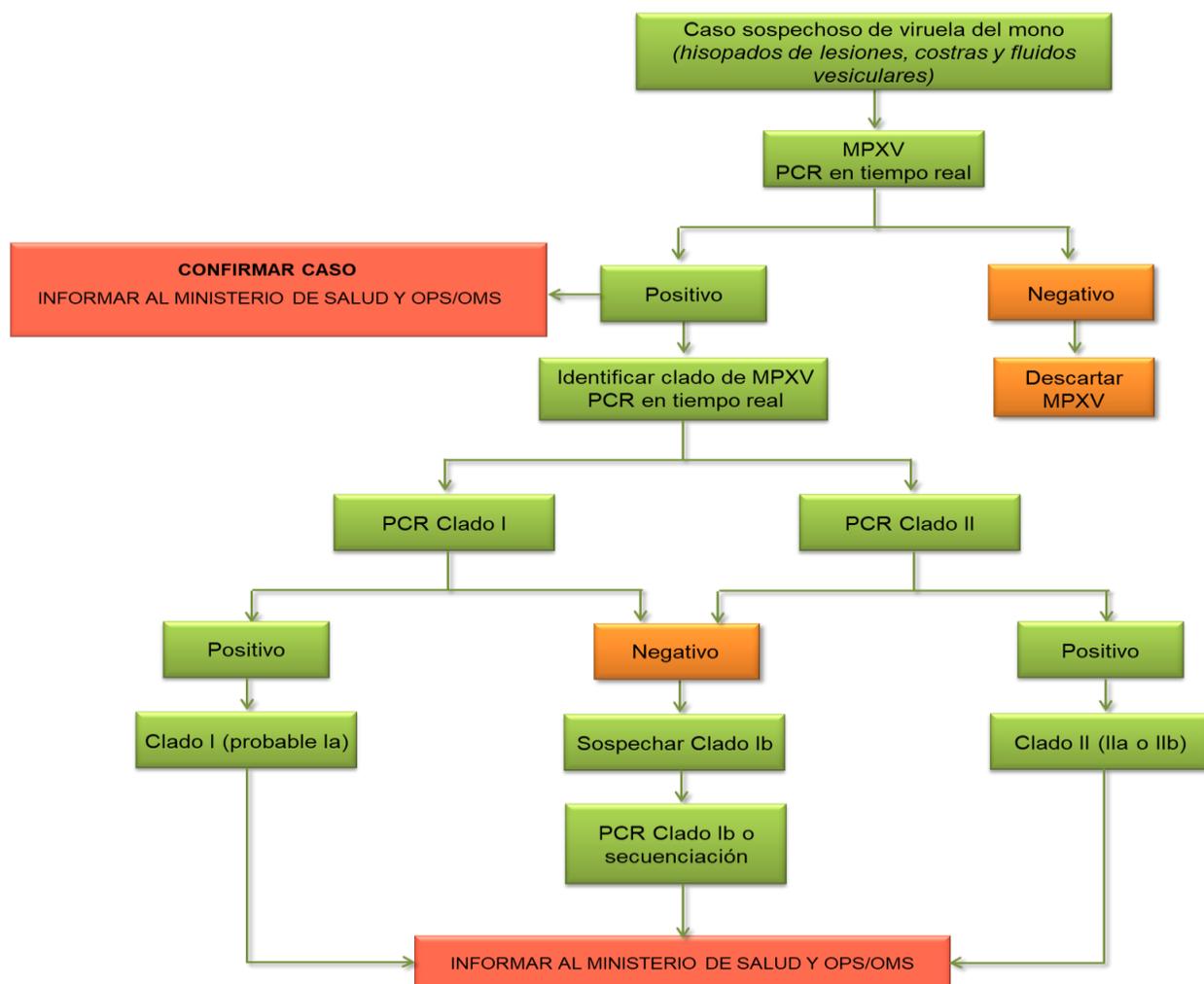
En este primer algoritmo, la PCR detecta cualquier OPXV, pero no identifica cual es la especie viral. Las muestras positivas son enseguida caracterizadas por PCR o secuenciación para detectar específicamente MPXV (ver abajo, Algoritmo 1). Mientras que es preferible realizar la prueba de confirmación específica para MPXV, detección positiva usando el ensayo de PCR de OPXV es considerado suficiente para confirmación laboratorial de casos sospechosos en países donde no circulan otros orthopoxvirus.



Algoritmo 2

El segundo algoritmo (recomendado) se basa en la detección genérica inicial de MPXV (que confirma la etiología), seguida de la diferenciación específica de los clados utilizando ensayos de PCR (ver abajo, Algoritmo 2). Desde 2022, OPS ha trabajado con los Estados Miembros en la implementación de este algoritmo de detección molecular de MPXV. El protocolo recomendado (Li *et al.*, *Journal of Virological Methods*. 2010. **169**, 223–7) ha sido publicado y está disponible en el siguiente enlace: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.07.012>. En el presente documento se adjunta un protocolo de trabajo (Anexo 1).

Este protocolo se basa en la identificación inicial de MXPV a través de una PCR genérica en tiempo real que detecta todas las cepas de MPXV, incluyendo los clados Ia, Ib, IIa y IIb. Si esta PCR genérica es positiva, es seguido por una reacción posterior dirigida para 2 blancos adicionales, una para el clado I y la otra para el clado II. La PCR específica para el clado II puede detectar virus de los clados IIa y IIb. Sin embargo, datos de secuenciación del actual brote del clado Ib en la Región de África muestra que una deleción en estos virus da como resultado una pérdida de detección con la PCR específica del clado I. Por este motivo, cuando se usa el protocolo recomendado, un resultado positivo con la PCR genérica seguido de un resultado negativo para ambos clados, I y II, podría estar indicando la presencia de un virus perteneciente al clado Ib.



Este hallazgo debe confirmarse mediante secuenciación. Como alternativa, ensayos nuevos están actualmente disponibles para la detección de virus del clado Ib (Incluyendo, Leonard *et al.*, *Euro Surveill.* 2024. **29**:pii=2400486. Disponible en: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2024.29.32.2400486>) (ver abajo, Algoritmo 2).

Reactivos (cebadores, sondas y controles positivos) para estos ensayos están siendo distribuidos por OPS/OMS en toda la región. Adicionalmente, protocolos específicos para el clado Ib están siendo evaluados y los reactivos correspondientes serán distribuidos dependiendo de los resultados de la validación.

Secuenciación

Los datos de secuenciación genómica son útiles para la identificación de los clados y subclados de MPXV. También pueden ser utilizados para monitorizar el potencial impacto de la evolución del virus en el rendimiento de los ensayos de PCR. También pueden proporcionar información valiosa para ayudar a comprender los orígenes, la epidemiología y las características del virus, por ejemplo, si los casos surgen de una sola introducción o de múltiples introducciones de otros lugares. Se alienta a los países y laboratorios a que compartan sus secuencias, incluidos los datos brutos, siempre que sea posible de manera oportuna a través de las bases de datos de acceso público disponibles.

Diagnóstico diferencial

Es importante considerar otras causas potenciales de lesiones cutáneas discretas o una erupción diseminada y otras etiologías para lesiones cutáneas de apariencia similar en las diferentes etapas de desarrollo, incluido el virus del herpes simple, el virus de la varicela zóster, el virus del molusco contagioso, el enterovirus, el sarampión, la sarna, zika, chikungunya, dengue, *Treponema pallidum* (sífilis), las infecciones bacterianas de la piel, las alergias a los medicamentos, los parapoxvirus y el chancroide, entre otros.

Muestras, material de recolección y temperatura de almacenamiento para detección de MPXV y diagnóstico diferencial

Tipo de espécimen	Materiales de colección*	Temperatura de almacenamiento	Finalidad de la recogida
Material de la lesión cutánea, que incluye: <ul style="list-style-type: none"> • Hisopado y/o exudado de la lesión • Borde superior de las lesiones (techos) • Costras de lesiones 	Hisopos de Dacrón o poliéster con VTM o hisopo seco	Refrigerar (2-8 °C) o congelar (- 20 °C o menos) durante una hora de la recolección; - 20°C o menos después de 7 días	Recomendado para el diagnóstico
Hisopo orofaríngeo	Hisopos de Dacrón o poliéster con VTM o hisopo seco	Refrigerar (2-8 °C) o congelar (- 20 °C o menos) durante una hora de la recolección; - 20°C o menos después de 7 días	Recomendado para el diagnóstico si es factible, además del material de la lesión cutánea
Suero	Tubos separadores de suero	Refrigerar (2-8 °C) o congelar (- 20 °C o menos) durante una hora de la recolección; - 20°C o menos después de 7 días	A ser considerado para serología o para Apoyar el diagnóstico o la investigación (siguiendo las pautas éticas)
Plasma	tubo de recogida con EDTA	Refrigerar (2-8 °C) o congelar (- 20 °C o menos) durante una hora de la recolección; - 20°C o menos después de 7 días	A ser considerado para serología o para apoyar al diagnóstico o la investigación (siguiendo las pautas éticas)

*Además de los materiales de recolección específicos indicados, otros materiales y equipos necesarios incluyen: contenedores de transporte y bolsas de recolección de muestras y empaques triples, refrigeradores y compresas frías o hielo seco, equipos estériles de extracción de sangre (por ejemplo, agujas, jeringas y tubos), etiquetas y marcadores permanentes, EPP y materiales para la descontaminación de superficies.

Ampliación de la red diagnóstica

Las pruebas centralizadas de MPXV pueden conducir a mayores tiempos de respuesta según la cantidad de muestras recibidas, el sistema de transporte de muestras, la capacidad del laboratorio nacional y la integración de los sistemas de vigilancia e información. Por lo tanto, para garantizar la confirmación oportuna de casos, el rastreo de contactos y la implementación de medidas de salud pública, podría ser necesaria la descentralización de la PCR de MPXV. Al planificar la expansión de la red de laboratorios MPXV, es importante tener en cuenta:

- La coordinación y supervisión de la red por parte del laboratorio nacional de salud pública
- Normativas nacionales y locales
- Requisitos de bioseguridad y biocustodia
- Capacitación del personal
- Control de calidad
- Ensayos de PCR que se utilizarán

El protocolo *in house* sugerido (Li et al., *Journal of Virological Methods*. 2010. **169**, 223–7, ver arriba) podría implementarse según la capacidad del laboratorio y se recomienda como protocolo de referencia.

Además, varios estuches comerciales están disponibles, incluyendo (pero no limitados) a los estuches mencionados en el Anexo 2. **Sin embargo, hasta la fecha, la OPS/OMS no ha recomendado ningún estuche comercial y cualquier estuche debe usarse solo después de una verificación/validación adecuada en estrecha colaboración con los laboratorios nacionales de salud pública.** Es importante monitorear el potencial impacto de la evolución del MPXV en el rendimiento de estos kits, ya que las mutaciones (incluidas las deleciones) pueden afectar tanto a los kits genéricos, como a los kits específicos de MPXV.

PRUEBAS EN ANIMALES

Mpox es una enfermedad zoonótica y es probable que, en las áreas endémicas, pequeños mamíferos actúen como reservorios virales. Una gran cantidad de especies animales son susceptibles a la infección por MPXV, incluyendo ardillas, ratas del género *Cricetomys*, perros, erizos, monos y posiblemente algunas razas de ratones, ratas y conejos domésticos. Para muchas otras especies, se desconoce la susceptibilidad. Hasta la fecha, no se ha demostrado que los reptiles, anfibios o aves sean susceptibles a la infección por MPXV o cualquier otro orthopoxvirus.

En el brote actual, se ha descrito esporádicamente casos de transmisión de MPXV de humanos a mascotas a través del contacto cercano. Las mascotas u otros animales que han estado en contacto con un caso humano probable o confirmado de viruela del simio y que **desarrollan síntomas de viruela del simio** dentro de los 21 días posteriores al contacto deben someterse a la prueba de la viruela del simio. Los síntomas en animales infectados no están completamente descritos, pero pueden incluir rash u otras lesiones en la piel, conjuntivitis, letargo, pérdida de apetito, tos, dificultad para respirar, secreciones o costras nasales, y/o fiebre.

Se deben seguir los procedimientos descritos anteriormente para la toma, manipulación y envío de muestras de animales. En animales con rash, se deben priorizar las muestras de piel (en particular, hisopos de la superficie y/o fluidos de la lesión, y costras). En animales sin afectación de la piel, los hisopados orofaríngeos, nasales o anales pueden ser útiles. Sin embargo, los datos sobre la sensibilidad de detección del virus para el diagnóstico en estos tipos de muestras son limitados, por lo que los resultados negativos deben interpretarse con precaución.

Al igual que en los seres humanos, las pruebas de infección por MPXV en animales se basan en la detección del ADN viral mediante PCR. Por tanto, los ensayos descritos anteriormente se pueden utilizar para analizar muestras animales. Dependiendo de las regulaciones locales y nacionales, las pruebas en muestras animales pueden realizarse en el mismo laboratorio que las muestras humanas o en laboratorios diferentes. En entornos donde las pruebas no están disponibles en los laboratorios de salud animal y donde los laboratorios de salud pública no pueden recibir muestras de animales, los países podrían considerar que la extracción de ADN se realice en un laboratorio de salud animal y la PCR en un laboratorio de salud pública.

Referencias

Organización Mundial de la Salud. Multi-country outbreak of mpox, External situation report#35- 12 August 2024. Geneva: WHO; 2024. Disponible en inglés: <https://www.who.int/publications/m/item/multi-country-outbreak-of-mpox--external-situation-report-35--12-august-2024>

Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Alerta Epidemiológica Viruela símica (MPXV clado I), 8 de agosto del 2024. Washington, D.C.: OPS/OMS; 2024. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/alerta-epidemiologica-viruela-simica-mpxv-clado-i-8-agosto-2024>

Organización Mundial de la Salud. Pruebas de diagnóstico para el virus MPXV: orientaciones provisionales, 10 de mayo de 2024. Disponible en: <https://www.who.int/es/publications/i/item/WHO-MPX-Laboratory-2024.1>

Organización Mundial de la Salud. Vigilancia, investigación de casos y rastreo de contactos para la viruela símica: orientaciones provisionales, 20 de marzo de 2024. Disponible en: <https://www.who.int/es/publications/i/item/WHO-MPX-Surveillance-2024.1>

Organización Mundial de la Salud. Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2023-2024. Ginebra: OMS; 2024. Disponible en inglés: <https://www.who.int/publications/i/item/789240089525>

Viruela símica: los expertos cambian el nombre de las variantes del virus. 12 de agosto de 2022. Ginebra: OMS; 2021. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/12-08-2022-monkeypox--experts-give-virus-variants-new-names>

Li Y, Zhao H, Wilkins K, Hughes C, Damon IK. Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA. J Virol Methods. 2010 Oct;169(1):223-7. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.07.012. Disponible en inglés: [doi: 10.1016/j.jviromet.2010.07.012](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.07.012)

Organización Panamericana de la Salud. Manual de mantenimiento para equipo de laboratorio. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/manual-mantenimiento-para-guias-laboratorio>

Organización Mundial de la Salud. Reglamento Sanitario Internacional (2005) Tercera edición. Ginebra: OMS; 2016. Disponible en: <https://www.who.int/es/publications/i/item/9789241580496>

Anexo 1

MPXV - Protocolo de PCR en tiempo real

Ensayos para detección genérica de MPXV (especie: *Orthopoxvirus monkeypox*, género: *Orthopoxvirus*) y de sus dos clados:¹

- Ensayo con cebadores y sonda G2R_G: detecta todas las cepas de MPXV
- Ensayo con cebadores y sonda C3L: detecta las cepas del clado Ia, pero no cepas del clado Ib
- Ensayo con cebadores y sonda G2R_WA: detecta las cepas del clado II (detecta clados IIa y IIb)
- Las secuencias de los iniciadores y sondas se encuentran al final del documento.
- Todas las sondas son de tipo sonda de hidrólisis (“TaqMan”) unida a fluoróforo FAM y *quencher* BHQ-1.

1. Mezcla

Las mezclas para cada uno de los ensayos (G2R_G, G2R_WA o C3L) se preparan por separado.

Componente	Volumen por reacción	Volumen por reacción
	EXPRESS qPCR Supermix Universal ²	TaqMan® Universal PCR Master Mix ³
agua (libre de ARNasa/ADNasa) ⁴	3.0 µl	3.0 µl
tampón de reacción (2x) ⁴	10.0 µl	10.0 µl
cebador <i>forward</i> (10 µM)	0.8 µl	0.8 µl
cebador <i>reverse</i> (10 µM)	0.8 µl	0.8 µl
sonda (10 µM)	0.4 µl	0.4 µl
Total por reacción	15 µl	

2. ADN

Añadir **5 µl** de ADN o control a los 15 µl de mezcla (volumen total de reacción: 20 µl).

Incluir **controles** positivos y negativos para evaluar la validez de la corrida.

¹ Li et al., *Journal of Virological Methods* **169**, 223–7 (2010).

² Invitrogen, números de catálogo: 11785-200, 11785-01K, 11795-200 o 11795-01K.

³ Applied Biosystems, números de catálogo: 4304437, 4364338, 4364340, 4305719, 4318157 o 4326708.

⁴ Los volúmenes son para uso de los estuches indicados y deben ajustarse cuando se utilicen otros estuches.

Descargo de responsabilidad: La mención de empresas específicas o de productos de ciertos fabricantes no implica que la Organización Panamericana de la Salud los apruebe o recomiende con preferencia a otros de naturaleza similar que no se mencionan.

3. Ciclaje⁵

Ensayo G2R_G o ensayo C3L	
EXPRESS qPCR Supermix Universal	TaqMan® Universal PCR Master Mix
2 pasos de:	2 pasos de:
50°C por 2 minutos (incubación UNG)	50°C por 2 minutos (incubación UNG)
95°C por 6 minutos (activación de la polimerasa)	95°C por 10 minutos (activación de la polimerasa)
45 ciclos de PCR:	45 ciclos de PCR de:
95°C por 15 segundos	95°C por 15 segundos
60°C por 30 segundos (lectura de la fluorescencia en este paso)	60°C por 30 segundos (lectura de la fluorescencia en este paso)

Ensayo G2_WA	
EXPRESS qPCR Supermix Universal	TaqMan® Universal PCR Master Mix
2 pasos de:	2 pasos de:
50°C por 2 minutos (incubación UNG)	50°C por 2 minutos (incubación UNG)
95°C por 6 minutos (activación de la polimerasa)	95°C por 10 minutos (activación de la polimerasa)
45 ciclos de PCR:	45 ciclos de PCR de:
95°C por 15 segundos	95°C por 15 segundos
62°C por 30 segundos (lectura de la fluorescencia en este paso)	62°C por 30 segundos (lectura de la fluorescencia en este paso)

⁵ Los tiempos de incubación UNG y de activación de la polimerasa son para uso de los estuches indicados y deben ajustarse cuando se utilicen otros estuches.

4. Secuencias de los cebadores y sondas

Ensayo G2R_G (detección genérica de MPXV)	
cebador G2R_G <i>forward</i>	5'-GGAAAATGTAAAGACAACGAATACAG
cebador G2R_G <i>reverse</i>	5'-GCTATCACATAATCTGGAAGCGTA
sonda G2R_G	5'FAM-AAGCCGTAATCTATGTTGTCTATCGTGTCC-3'BHQ1

Ensayo G2_WA (detección de las cepas del clado II)	
cebador G2R_WA <i>forward</i>	5'-CACACCGTCTCTCCACAGA
cebador G2R_WA <i>reverse</i>	5'-GATACAGGTTAATTTCCACATCG
sonda G2R_WA	5'FAM-AACCCGTCGTAACCAGCAATACATTT-3'BHQ1

Ensayo C3L (detección de las cepas del clado Ia)	
cebador C3L <i>forward</i>	5'-TGTCTACCTGGATACAGAAAGCAA
cebador C3L <i>reverse</i>	5'-GGCATCTCCGTTTAATACATTGAT
sonda C3L	5'FAM-CCCATATATGCTAAATGTACCGGTACCGGA-3'BHQ1

Anexo 2

Potenciales opciones comerciales para PCR de MPXV

Compañía	Estuche	Referencia	Blanco	Componentes y controles del estuche	Transporte	Reactivos adicionales requeridos	Revisión	Vencimiento
Shanghai ZJ Bio-Tech Co	Liferiver Monkeypox Virus Real Time PCR Kit	ZD-0076-02 25 pruebas/estuche	Genes MPXV F2L/F3L Control interno	Extracción de ADN Master mix Enzima Control positivo	Hielo seco	Ninguno	Revisión de la documentación por OMS Validación en curso	12 meses
Tib Molbiol	LightMix® Modular Monkeypox	53-0550-96 96 pruebas/estuche (también distribuido por Roche)	Genes MPXV J2L/J2R Control interno	Iniciadores y sondas liofilizados Control positivo liofilizado	4-25 °C	Estuche de extracción Enzima: 1-step RT qPCR (Referencia: 90-9999-96, 96 pruebas/estuche, envío a 4-25 °C) u otra enzima	Revisión de la documentación por OMS Validación en curso	12 meses
Jiangsu Bioperfectus Technologies	Monkeypox Virus Real Time PCR Kit	YJC70115NW- 50T 50 pruebas/estuche	Gen MPXV F3L Control interno	Mezcla de reacción Mezcla de detección (iniciadores/sonda) Control positivo	Hielo seco	Estuche de extracción	Validación por NCDC (Nigeria)	12 meses
KH Medical	RADI Monkeypox Detection Ki	RV015 100 pruebas/estuche	Clado I Clado II Control interno	Master mix Enzima Control positivo	Hielo seco	Estuche de extracción	Validación por INRB (República Democrática del Congo) vs protocolo in house del CDC protocol con muestras del clado I	12 meses
Genes2Life	PoxVirDetect	G2LPVSP-01 120 pruebas/estuche (limitaciones de exportación)	MPXV (genérica o específica de clado) Control interno	Mezcla de reacción Control positivo	Hielo seco	Estuche de extracción	Verificación por InDRE (México)	12 meses

Descargo de responsabilidad: La mención de empresas específicas o de productos de ciertos fabricantes no implica que la Organización Panamericana de la Salud los apruebe o recomiende con preferencia a otros de naturaleza similar que no se mencionan.