

Directrices de laboratorio para la detección y el diagnóstico de la infección por el virus de la viruela del mono

23 mayo 2022

Este documento está basado en la guía provisional de la Organización Mundial de la Salud sobre las pruebas de laboratorio para el virus de la viruela del mono, 23 de mayo de 2022, y tiene por objeto proporcionar orientación a los Laboratorios Nacionales de Referencia sobre la detección del virus de la viruela del mono.

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*) conocidos de MPXV, uno endémico en África occidental y otro en la región de la cuenca del Congo.

Después de una incubación que puede ir de 6 a 16 días, la presentación típica de la viruela del mono 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 la viruela del mono 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 (SOP) 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, 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 viruela del mono. 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 viruela símica 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 centrífuga 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 la viruela del mono 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.

Se debe frotar vigorosamente la lesión para garantizar que se recolecte suficiente material para la obtención del ADN viral. Los hisopados se pueden coleccionar en tubos secos o en tubos con medios de transporte viral (VTM). 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 la viruela del mono 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 por vía aérea, los especímenes de casos sospechosos probables o confirmados de MPXV deben transportarse como Categoría A, UN2814 "sustancia infecciosa, que afecta a los seres humanos".

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 2021-2022](#) (disponible solo en inglés) para obtener información sobre los requisitos de envío de sustancias infecciosas.

En caso de que su país tenga disponible un envío de categoría A, la muestra puede ser inactivada y enviada como material exento. El proceso de inactivación puede ser realizado en Laboratorio de salud Pública en un ambiente de bioseguridad de nivel 2. Protocolos y métodos de inactivación sugeridos por OPS pueden ser encontrados en el siguiente enlace: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2014/2014-cha-procedures-inactivation-ebola.pdf>

Para envío de muestras completas o inactivadas a laboratorios de referencia internacionales, comuníquese con el Equipo de Respuesta de Laboratorio de la OPS (ricoj@paho.org con copia a: 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 viruela del mono.

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 (rico@paho.org).

Métodos 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.

Varios grupos de investigación han desarrollado protocolos de PCR validados para la detección de OPXV y más específicamente MPXV, algunos de los cuales incluyen la distinción de los clados de la cuenca del Congo y África occidental.

Algunos protocolos implican dos pasos, en los que la primera reacción de PCR detecta el género OPXV, pero no identifica la especie. Este puede ser seguido por un segundo paso, que puede estar basado en PCR o utilizar secuenciación para identificar específicamente MPXV (ver abajo, Algoritmo 1), además de información genómica adicional. Otros protocolos (recomendados) están basados en la detección inicial genérica de MXPV (confirmando la etiología), seguido de otros ensayos de PCR adicionales para diferenciación de los clados (ver abajo, Algoritmo 2).

Los kits de PCR que detectan OPXV o específicamente MPXV están en desarrollo; kits comerciales validados para PCR no están ampliamente disponibles.

Extracción de ADN

El ADN se puede extraer de las muestras mencionadas anteriormente utilizando cualquier protocolo de extracción estándar o estuches comerciales. En general, la etapa de lisis de la muestra en la extracción de ADN inactiva cualquier virus vivo. Para la extracción a partir de costras de la lesión, se debe utilizar un kit de extracción de ADN para tejidos lo cual asegura una adecuada lisis de la muestra.

Detección molecular

La OPS está trabajando para apoyar a todos los Estados Miembros, a través de los laboratorios nacionales de referencia, para implementar la capacidad de realizar pruebas moleculares para MPXV.

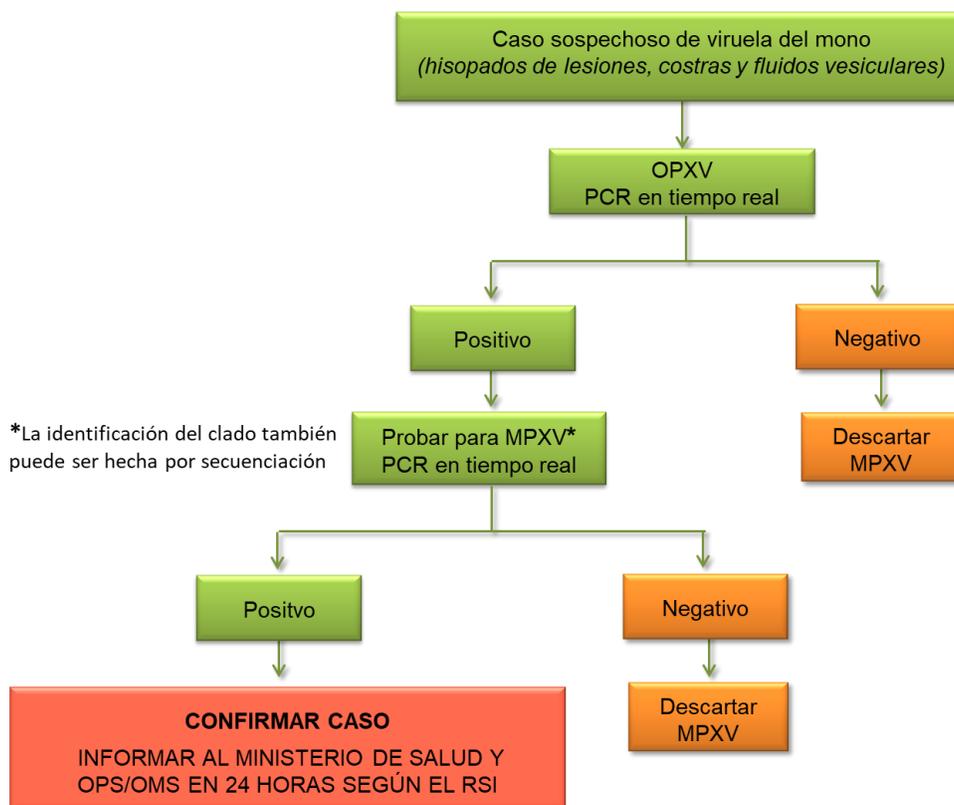
El protocolo sugerido (Li et al., *Journal of Virological Methods*. 2010. 169, 223–7) se ha publicado y está disponible en el siguiente enlace: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.07.012> Protocolo detallado se adjunta al final del presente documento (Anexo 1).

Este protocolo se basa en la detección inicial de MXPV a través de una PCR genérica en tiempo real. Si es positivo, es seguido por una reacción posterior dirigida para 2 blancos adicionales, una para el clado de MPXV de África Occidental y la otra para el clado de la Cuenca del Congo.

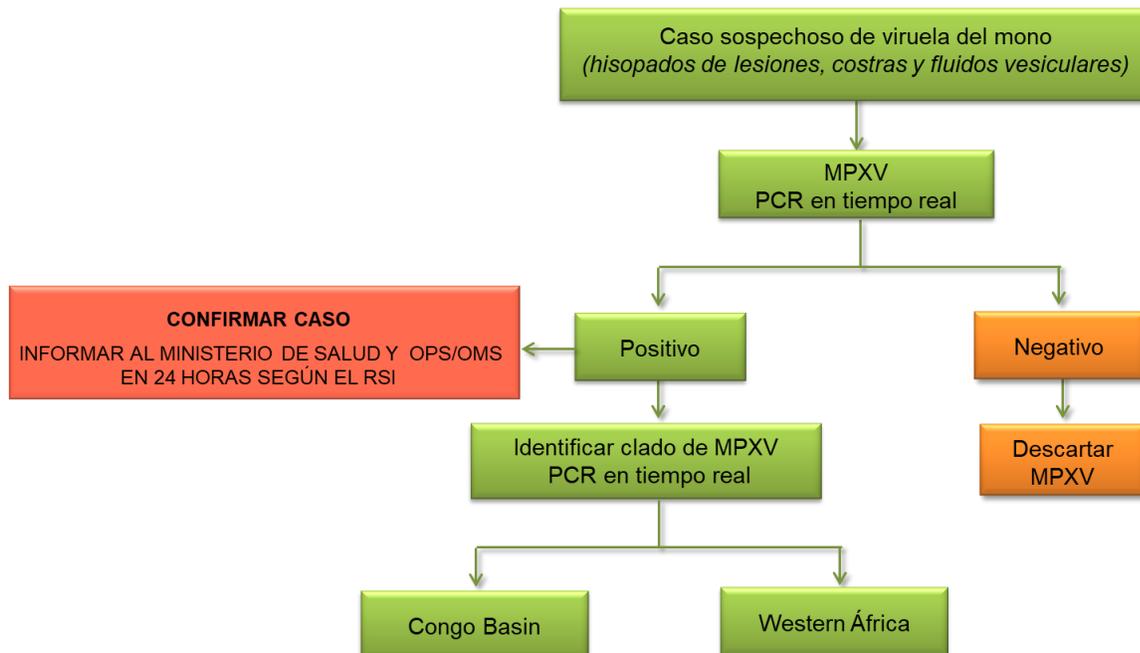
La OPS/OMS estará distribuyendo reactivos específicos (cebadores, sondas y controles positivos) y protocolos de trabajo para ensayos OPX y MPXV en toda la Región.

A continuación, se presentan los posibles algoritmos diagnósticos para PCR inicial de OPXV o para PCR específica de MPXV

Detección molecular, Algoritmo 1



Detección molecular, Algoritmo 2



Interpretación de los resultados y reporte de datos

La confirmación de la infección por MPXV debe considerar la información clínica y epidemiológica.

La detección positiva mediante un ensayo de PCR OPXV seguido de la confirmación de MPXV a través de PCR y / o secuenciación, o la detección positiva mediante el ensayo de PCR MPXV en casos sospechosos en áreas endémicas y no endémicas indica la confirmación de la infección por MPXV.

Si bien es preferible realizar pruebas confirmatorias específicas de MPXV, la detección positiva mediante el ensayo de PCR OPXV se considera suficiente para la confirmación de laboratorio de casos sospechosos en países no endémicos.

Los datos de secuenciación genómica 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.

De acuerdo con el Reglamento Sanitario Internacional (RSI), todos los casos confirmados de viruela símica deben notificarse dentro de las 24 horas a través de los canales oficiales del RSI.

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 de 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.

Referencias

Organización Panamericana de la Salud. Alerta Epidemiológica Viruela símica en países no endémicos - 20 de mayo de 2022. Washington, DC: PAHO;2022. Available at: <https://www.paho.org/es/documentos/alerta-epidemiologica-viruela-simica-paises-no-endemicos-20-mayo-2022>

Organización Mundial de la Salud. Pruebas de laboratorio para el virus de la viruela del mono. Ginebra: OMS; 2022. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-MPX-laboratory-2022.1>

Organización Mundial de la Salud. Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2021-2022. Ginebra: OMS; 2021. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240019720>

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: [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>

World Health Organization. Laboratory biosafety manual, 4th edition. Geneva: WHO; 2022. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240011311>

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

Anexo 1

Virus de la viruela del mono (*Monkeypox virus*, MPVX) Protocolo de PCR en tiempo real

Ensayos para detección genérica de MPVX (especie: *virus Monkeypox*, género: *Orthopoxvirus*) y de sus dos clados:¹

- Ensayo con cebadores y sonda G2R_G: detecta todas las cepas de MPVX
- Ensayo con cebadores y sonda G2R_WA: detecta las cepas del clado de África occidental
- Ensayo con cebadores y sonda C3L: detecta las cepas del clado de la cuenca del Congo
- 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 de África occidental)	
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 de la cuenca del Congo)	
cebador C3L <i>forward</i>	5'-TGTCTACCTGGATACAGAAAGCAA
cebador C3L <i>reverse</i>	5'-GGCATCTCCGTTTAATACATTGAT
sonda C3L	5'FAM-CCCATATATGCTAAATGTACCGGTACCGGA-3'BHQ1