Revista Ecuatoriana de **Ciencia, Tecnología e Innovación en Salud Pública**

CÓDIGO ISSN 2588-0551
DOI: 10.31790/inspilip.v7i22.432

Artículo de Revisión

Técnicas moleculares usadas en el diagnóstico y estudio del virus de la viruela símica

Molecular Techniques used in the diagnosis and study of the Monkeypox Virus

Aly Daniel Monteros-Cedillo [a], * aly_monteros_@hotmail.com
Carlos Enrique Flores-Montesinos [a], cflores@ucacue.edu.ec
Freddy Damián Castillo-Solano [a], fcastillos@ucacue.edu.ec

a. Universidad Católica de Cuenca, Cuenca, Ecuador.
***Correspondencia:** Aly Daniel Monteros Cedillo **Email:** aly_monteros_@hotmail.com

Identificación de la responsabilidad y contribución de los autores: Los autores declaran haber contribuido en idea original (DM), parte metodológica revisión sistemática (DM,CF,FC), redacción del borrador (DM,FC) y redacción del artículo (DM,CF,FC).

Fecha de Ingreso: 3/7/2023.
Fecha de Aprobación: 17/8/2023.
Fecha de Publicación:20/8/2023.

Resumen

La Organización Mundial de la Salud, en julio de 2022, declara a la viruela del mono como un problema público de salud por brotes epidémicos en países que no han reportado esta enfermedad previamente. Esta patología infecciosa es causada por uno de la familia orthopoxvirus, endémico de África central y occidental, que ha sido considerado relevante por ser el orthopoxvirus más importante internacionalmente. Actualmente, una detección rápida de la enfermedad es importante para control epidemiológico, y se realiza principalmente por técnicas moleculares de detección como: amplificación mediada por recombinasa (RPA), GeneXpert, PCR en tiempo real y amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP). El objetivo fue describir las técnicas moleculares usadas en el diagnóstico y estudio del virus de la viruela símica. Las pruebas de detección molecular, a pesar de ser distintas en su metodología, presentaron una alta sensibilidad y especificidad en la detección de los genes diana. Sin embargo, los estudios realizados en RPA, a pesar de que fueron rápidas con un tiempo entre 7 – 30 minutos, presentaron mejores límites de detección en relación a las otras pruebas y detectaron a los genes: G2R, G2L y la proteína de unión al factor de necrosis tumoral, sugiriendo una alta confiabilidad.

Palabras clave: Virus de viruela símica, Viruela símica, Técnicas de Laboratorio Clínico, Técnicas de detección molecular.

Acceso abierto

Citación

Monteros A., Flores C., Castillo F. Técnicas moleculares usadas en el diagnóstico y estudio del virus de la viruela símica. I**NSPILIP. 2023; Vol. 7, Núm. 22.**

Revista científica INSPILIP. Volumen 7, Número 22, mayo - agosto de 2023.

El autor declara estar libre de cualquier asociación personal o comercial que pueda suponer un conflicto de intereses en conexión con el artículo, así como el haber respetado los principios éticos de investigación, como por ejemplo haber solicitado las autorizaciones de la institución donde se realizó el estudio, permiso para utilizar los datos, consentimientos informados y en caso de tratarse de estudio observacionales y ensayos clínicos, autorización de un CEISH, ARCSA, Medio Ambiente, entre otros, de acuerdo a la categoría. Además, la licencia para publicar imágenes de la o las personas que aparecen en el manuscrito. Por ello INSPILIP no se responsabiliza por cualquier afectación a terceros, tampoco el INSPI como entidad editora, ni el Editor, la responsabilidad de la publicación es de absoluta responsabilidad de los autores.

Patricio Vega Luzuriaga
EDITOR EN JEFE

Abstract

In July 2022, the World Health Organization declared Monkeypox a public health issue due to epidemic outbreaks in countries that had not previously reported them. Monkeypox is caused by a virus of the orthopoxvirus family, endemic to Central and Western Africa, being considered as the most significant strain of orthopoxvirus internationally. The rapid detection of the disease is of utmost importance for epidemiological control. Molecular laboratory techniques used for detection are: real time PCR, recombinase polymerase amplification (RPA), GeneXpert and loop-mediated isothermal amplification (LAMP). The objective of this study is to describe the molecular techniques used in the diagnosis and study of the Monkeypox virus. Molecular screen testing, despite being different from its methodology, showed high sensibility and specificity in detecting the targeted gene. However, the studies performed with RPA, even though they were fast, with time used oscillating between between 7 and 30 minutes, and presented the best detection limits compared with the other tests; also, they detected the genes: G2R, G2L and the protein that induces the tumor necrosis factor, which suggests high reliability.

Keywords: *Monkeypox virus, Monkeypox, Clinical laboratory techniques, Molecular Diagnostic Techniques.*

Introducción

La viruela del mono es una patología de carácter infecciosa ocasionada por orthopoxvirus (1) es zoonótica y endémica de zonas de selva tropical en África occidental y central (2). Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS), en julio de 2022, declara a esta infección como un problema de salud pública debido a brotes epidémicos en países que jamás han reportado esta enfermedad (3).

Los orthopoxvirus son un género que abarcan: virus de la viruela bovina, vaccinea (empleado en la vacuna contra la viruela), y virus de la variola (4). Sin embargo, a pesar de que en 1980 es declarada erradicada por el sistema de vacunación, el virus de la viruela símica es considera el orthopoxvirus más importante internacionalmente (5).

En el 2022, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) ha reportado 78.379 casos de la viruela símica en todo el mundo, siendo el 98 % en ubicaciones que no han presentado históricamente esta patología (6). Además, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) manifestó que en las Américas mantienen alrededor de los 40.000 casos (3,6).

Por otra parte, la OPS asegura que puede ser muy difícil el diagnóstico en función a la clínica del paciente, debido a la gran cantidad de patologías que se caracterizan por erupciones cutáneas. Es por esta razón que se debe ofrecer una prueba de detección molecular al paciente que se considere como un caso sospechoso (7,8). No obstante, a pesar de que se considere al PCR en tiempo real como el "gold standard" para la detección de la viruela símica (9), las dificultades técnicas por costos operativos y tiempo de lectura, ha hecho que se implementen técnicas novedosas en la detección molecular (10).

Por lo tanto, la finalidad de esta revisión es describir las técnicas moleculares usadas en el diagnóstico y estudio del virus de la viruela símica.

Desarrollo

Definición

En 1958, en monos cynomolgus se identificaron erupciones pustulares que resultaron ser causadas por el virus de la viruela símica (11). Estos fueron enviados desde África a Copenhague, con fines investigativos; de ahí, el nombre (12). En la década de los 70', en la República Democrática del Congo (RDC) se notifica del primer caso en un pediátrico de 9 meses de edad (13). Dos clados se han identificado desde entonces: las cepas de África Occidental y las de África Central. La letalidad de estas es de 3.6 % y 10.6 % respectivamente (14). La cepa de África Occidental generalmente da infecciones más autolimitadas, mientras que la cepa de África Central se asocia a mayor letalidad y transmisibilidad (15).

Al ser un virus de DNA, la viruela símica corresponde a la familia de los Pokviridae pertenecientes al género Orthopoxvirus (16). Los Pokviridae se clasifican en dos subfamilias: Choropoxvirinae y Entomopoxvirinae (17). En la subfamilia de los Choropoxvirinae, hay cuatro géneros que pueden inducir enfermedades en humanos, entre estos, los Orthopoxvirus. Este género contiene varios virus que infectan humanos como: virus de la viruela bovina, viruela del mono, virus de la viruela, entre otros (12).

Genoma viral

El virus de la viruela símica mide entre 200 – 250 nanómetros y presenta una doble cadena de DNA del genoma que mide aproximadamente 197.2 kilobases (kb) y es capaz de codificar 181 proteínas. El genoma es lineal y presentan extremos en horquillas (3' y 5'). Los 10 kb de las repeticiones terminales invertidas (ITR) se localizan en los extremos del genoma. Por otra parte, los genes de "mantenimiento" se localizan en el área central y se encargan de los procesos de: replicación, transcripción y ensamblaje viral. Los genes codificados en las terminales del genoma varían y lo diferencia de otros poxviridae. Además, producen proteínas implicadas en la enfermedad y propagarse en otros hospederos (18).

La replicación viral se da a nivel citoplasmático de las células infectadas. La endocitosis viral, la micropinocitosis y la fusión de membrana celular, facilitan la entrada del virus a la rofaringe, nasofaringe, tejido celular subcutáneo, intradérmico e intramuscular. Además, la fagocitosis inmunomediada se desencadena por la replicación viral, haciendo que el virus se propague por: ganglios linfáticos, amígdalas, sangre, bazo, entre otros órganos (18).

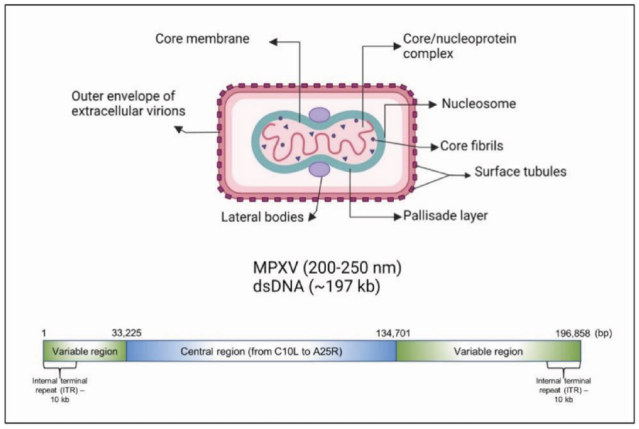

Figura 1: Estructura y genoma del virus de la viruela símica. **Disponible en**: Karagoz A, Tombuloglu H, Alsaeed M, Tombuloglu G, AlRubaish AA, Mahmoud A, et al. Monkeypox (mpox) virus: Classification, origin, transmission, genome organization, antiviral drugs, and molecular diagnosis. J Infect Public Health. 2023 Apr 1;16(4):531–41.

Evolución del genoma del virus de la viruela símica

Los poxviridae mutan alrededor de 10−5 y 10−6 veces por replicación. En el brote del año 2022, en Estados Unidos, se evaluó la secuencia genómica del virus y se pudo determinar la gran cantidad de mutaciones en comparaciones con los anteriores estudios. Estas mutaciones se dieron principalmente en el gen APOBEC3 (del inglés, apolipoprotein B mRNA Editing Catalytic Polypeptide-like 3) en la porción 5' guanina adenina – adenina adenina (18).

En Alemania, durante el brote de 2022, Jones et al. (19) analizaron 47 secuencias genómicas del virus. Se observó que hubo cambios en aminoácidos no sinónimos en comparación con cepas anteriores al brote. Se analizaron cambios en la región 5' del gen APOBEC3 que se duplicó en secuencia de dos lesiones en un mismo paciente. Además, debido a una translocación en los extremos del genoma, cuatro genes cerca del extremo 3' se eliminaron o interrumpieron. Esta reorganización genómica es importante para los Orthopoxvirus debido a que le da ventajas evolutivas y les permite adaptarse en esta, sin precedentes, transmisión de persona a persona en el actual brote (19).

En las zonas terminales del genoma, es más visible la plasticidad genómica de los Orthopoxvirus por sus dos repeticiones terminales invertidas (ITR). La modificación de estas áreas facilita la adaptación del virus al cambio de huéspedes. Además, las diferencias entre las ITR de los clados de África occidental y central sugieren la evolución del virus aumentando: la virulencia, transmisibilidad y evasión inmunitaria. Por lo que se sugiere que estos cambios aumentarían los casos de viruela símica en un corto o largo plazo (18).

Epidemiología

Desde el primer caso reportado en 1970, esta patología se ha esparcido a países próximos de la región, especialmente en el Centro–Oeste de África (13). En el 2003, se reportaron a los primeros pacientes contagiados de viruela símica fuera del continente africano, identificándose 72 casos sospechosos o confirmados en Estados Unidos. Estos pacientes se infectaron por estar en contactos con animales infectados previamente con pequeños mamíferos importados de países africanos (20).

En mayo de 2022, se confirma por la OMS el primer caso en Reino Unido. Era una persona que viajó previamente a Nigeria. Varios días después, dos casos más fueron identificados. Estas no

presentaron viajes previamente, ni estuvieron en contacto con el caso que se reportó días previos (21). Los hombres jóvenes han sido el grupo etario más reportado con casos de viruela símica; estos fueron identificados como hombres que tienen sexo con hombres (HSH), sin previo viaje a países endémicos (22). En la actualidad, la cepa de África Occidental ha sido aislada recientemente en este brote internacional (15). En el 2022, el CDC ha reportado 78.379 casos, mientras que en América Latina son alrededor de 40.000 casos (3,6).

Transmisión

Animales infectados pueden transmitir la enfermedad a un humano mediante: mordeduras, arañazos y la mal cocción de la carne de estos (15). No obstante, el reservorio definitivo del virus no ha sido claramente identificado, ya que ha sido aislado de varios animales como: mamíferos pequeños y primates no humanos (23). Por otra parte, el contacto piel con piel o con fómites como: sábanas, ropa y el intercambio de secreciones respiratorias; pueden ser factores de riesgo para la transmisión entre humanos (24).

A pesar de ser una transmisión de carácter zoonótica, no se ha logrado distinguir apropiadamente el reservorio natural del agente patógeno. Entre los más estudiados son: monos, ardillas de árbol, roedores, marsupiales de Gambia, etcétera (25) . La transmisión se podría dar por el contacto con las lesiones de estos animales (26). Además, la transmisión entre personas se debe al contacto directo con: fómites contaminados, lesiones dérmicas, gotículas o aerosoles de pacientes infectados. Por otra parte, los pacientes que tienen más riesgo de contagio son aquellos que tienen contacto doméstico y comparten habitaciones con personas infectadas (26). Además, la OMS considera a las relaciones sexuales como un factor de riesgo muy importante en ciertas poblaciones, especialmente entre HSH, particularmente sin protección y con múltiples parejas (26).

- **Presentación clínica**

Fase de la infección	Duración (días)	Característica
Enantema	N/A	Lesiones inician en boca y lengua.
Máculas	1 – 2	En cara, extremidades y genitales.
Pápulas	1 – 2	Lesiones maculares progresan a papulares.
Vesículas	1 – 2	Lesiones vesiculares se suelen presentar.
Pústulas	5 – 7	• Pústulas elevadas, redondas y firmes al tacto. • Preceden a las costras.
Costras	7 – 14	• Pústulas se forman costras a la segunda semana.

Tabla #1: Presentación clínica de la viruela símica. **Obtenido de:** Clinical Recognition | Monkeypox | Poxvirus | CDC [Internet]. 2022 [cited 2022 Dec 1]. Available from: https://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/clinicians/clinical-recognition.html.

Los pacientes son infecciosos desde el momento que presentan síntomas. En raras ocasiones, los pacientes presentar complicaciones como: encefalitis, sobreinfección bacteriana, neumonitis, queratitis y conjuntivitis. Esto se puede asociar a la salud inicial del individuo (15,27).

Diagnóstico

El diagnóstico de la viruela símica basado solamente en la clínica es insuficiente, debido a los signos y síntomas de otros poxviridae, muy similares a la de la viruela símica. Por esta razón, se debe utilizar técnicas moleculares de diagnóstico rápido para un control epidemiológico apropiado. El método de elección es la PCR en tiempo real; sin embargo, en ciertos países puede encontrarse limitaciones principalmente en el costo de los equipos (28).

Por otra parte, no se ha limitado el uso de pruebas moleculares, ni el número de genes diana a utilizar. Sin embargo, se debe considerar que toda prueba molecular debe detectar al menos un gen diana para identificar la presencia del virus (29).

Técnicas moleculares

Las pruebas moleculares para la detección del virus incluyen: prueba de PCR en tiempo real (qPCR), amplificación de polimerasa de recombinasa (RPA), geneXpert y tecnología de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) (30).

PCR en tiempo real

De acuerdo a las recomendaciones de la OMS, la PCR es la prueba más efectiva, por lo que, es considerada el gold standard para la detección de bases nucleicas (31,32). La qPCR, también conocido como PCR cuantitativa, detecta la presencia del patógeno, principalmente virus, sin la necesidad de electroforesis y en tiempo real. La utilización de: sondas, cebadores o moléculas fluorogénicas facilita la detección de los amplicones. Durante la amplificación, se logra la detección de la fluorescencia, lo que cuantifica los amplicones en el PCR en tiempo real. El registro de la transmisión emitida por la fluorescencia se da en la amplificación del gen, mediante un equipo de sensor óptico y los resultados se evidencia con la presencia de una curva que tiene 4 fases distintas y reflejan la eficiencia de la amplificación y el umbral de ciclo de la prueba. Se utiliza el umbral de ciclo de la prueba para elaborar una curva estándar con valores obtenidos de distintas cantidades de esa molécula, esto para determinar el número de copias de gen diana. En pocas palabras, se compara la curva estándar con el umbral de ciclo de permitiendo analizar el número de copias del gen diana (33).

La principal limitación del PCR en tiempo real es que requiere un laboratorio acondicionado y un soporte estructural óptimo para trabajar con esta tecnología, lo que aumenta el tiempo de análisis y el costo. Además, se necesita un manejo, pretratamiento y transporte altamente especializado (34).

Técnica de amplificación mediada por recombinasa (RPA)

La técnica de amplificación mediada por recombinasa (RPA) es una prueba rápida, sencilla y específica para la amplificación de bases nucleicos que requiere una temperatura constante (35). A diferencia del PCR, esta no requiere desnaturalizar la temperatura con calor debido a que la actividad enzimática hibrida los cebadores en la región objetivo (36). Para la amplificación del gen diana, la RPA utiliza, principalmente, tres proteínas y enzimas como: recombinasa, polimerasa de desplazamiento de cadena y proteínas de unión al ADN monocatenario. La recombinasa se une a los cebadores para formar el complejo cebador – recombinasa, facilitando la desnaturalización. Además, la proteína de unión al ADN monocatenario estabiliza la cadena desnaturalizada y permite que los cebadores se hibridan en la región diana (33).

La duración de la prueba puede ser entre 10 – 30 minutos y requiere una temperatura entre 37 – 42 Cº (33,37,38).

En comparación con las pruebas PCR, es más fácil de usar y no requiere componentes tan costosos, siendo útil en entornos de bajos recursos (35).

La principal limitación del RPA es que esta prueba se utiliza principalmente en investigación científica, por lo que su uso es limitado. Además, los kits de RPA son costosos y difíciles de conseguir (39).

GeneXpert

GeneXpert es una prueba semicuantitativa que amplifica y purifica los ácidos nucleicos del virus. Este utiliza un cartucho para evitar contaminar la muestra (40). Esta tecnología se la emplea principalmente en el diagnóstico de Mycobacterium Tuberculosis con resistencia a la rifampicina, virus del ébola y Stafilococo Aureus resistente a la meticilina (40,41). Según Li D et al. (40), el ensayo con GeneXpert mostró una alta sensibilidad (100 %) y especificidad (100 %) en muestras de casos sospechosos de pacientes con la viruela símica, siendo muy preciso independientemente del tipo de muestra recolectada (vesícula o costra). Una de las ventajas del uso de GeneXpert es la mínima manipulación de la muestra antes de cargar en el cartucho y la automatización del equipo. Por otro lado, se menciona que la prueba presenta ciertos factores negativo como el alto costo de la máquina GeneXpert de aproximadamente 60.000 USD.

Método de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)

El método de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) se caracteriza por realizar una amplificación de manera más rápida y económica en comparación a otras técnicas (42). Requiere una temperatura constante entre 60 – 65 Cº y la técnica requiere la utilización de 4 – 6 cebadores que permitan la formación de horquillas en las primeras fases de síntesis del ADN (33,43,44). Siendo indispensable un correcto diseño de los cebadores. Estos cebadores reconocen de 6 – 8 regiones distintas del gen diana; por lo que, se considera al LAMP como una prueba altamente

precisa y eficaz (33).

A diferencia de otras técnicas moleculares, el LAMP amplifica el ADN no desnaturalizado. Esto se da con la ayuda de enzimas específicas como: Bsm ADN polimerasa y Bst ADN polimerasa y conservan su actividad enzimática a 63 Cº y 66 Cº, respectivamente. Estas enzimas catalizan 5'–3', así como la polimerización de ADN 3' – 5', ya que posee actividad de desplazamiento de cadena (33).

No obstante, LAMP tiene ciertas limitaciones como la contaminación cruzada, la cual puede estar presente en aerosoles. Los investigadores deben ser conscientes de estas posibilidades y mantener correctas ventilaciones y análisis de muestras por separado (45).

Metodología

El presente estudio es una revisión bibliográfica de tipo narrativa.

Identificación: Se realizó una búsqueda basándose en los Descriptores de Ciencias de la Salud (DeCS) y MeSH utilizando términos como: "monkeypox", "monkeypox virus", "Clinical laboratory techniques", "Molecular Diagnostic Techniques". Se establecieron las siguientes estrategias de búsqueda "monkeypox AND Clinical laboratory techniques", "monkeypox virus AND Clinical laboratory techniques", "monkeypox virus AND Clinical laboratory techniques AND Molecular Diagnostic Techniques".

Tamización: Se aplicaron criterios de inclusión de los términos en búsqueda, resumen, palabras claves o título; publicaciones en español e inglés; artículos originales y tuvo como objetivo técnicas de detección molecular en pacientes con viruela símica. Estudios encontrados se analizaron para descartar títulos duplicados. Algunas sintaxis para la búsqueda fueron: Pubmed "(("Monkeypox"[Mesh]) AND ("Clinical Laboratory Techniques"[Mesh], Science direct "((monkeypox virus AND clinical laboratory techniques AND molecular laboratory techniques))".

Elección: Se aplicaron los criterios de exclusión como: tesis, carta al editor, ensayos clínicos, pacientes pediátricos, embarazadas; además, estudios no disponibles en la base de datos consultadas. Inclusión: Se incluyeron estudios que cumplieron con los requisitos, analizando las variables de forma cualitativa: año, autor, título, nombre de la revisa, diseño de estudio, resultados, conclusiones.

Limitaciones: Las limitaciones del trabajo se debieron a: acceso restringido, idioma, estudios recientes no finalizados.

Nº	Técnica molecular	Autor/Año	Título del artículo	Gen diana	Límite de detecciones	Sensibilidad	Especificidad	Conclusiones
1	PCR en tiempo real	Mills M et al(46). 2023	Evaluation and clinical validation of monkeypox (mpox) virus real-time PCR assays	• F3L • G2R	65,6 copias/ml	96.8%	-	La sensibilidad de estos genes fueron elevadas. Sin embargo, el gen G2R presentó una reacción de ciclos (Ct) ligeramente menor al del gen F3L, seguramente a la presencia de dos copias en la región ITR del genoma. No obstante, el CDC avisó en septiembre de 2022 deleciones del gen G2R, lo que podría afectar al diagnóstico molecular. El CDC no ha reportado dicha deleción con el gen F3L.
2		Luciani L et al (47). 2021	A novel and sensitive real-time PCR system for universal detection of poxviruses	D6R	$<10^3$ copias/reacción	100%	99.8%	Se describió al primer sistema que localiza una secuencia de nucleótidos conservado entre todos los poxviridae con una especificidad de 99.8% y sensibilidad de 100%. El gen diana D6R forma parte de los "genes centrales" todos los poxvirus, incluyendo la viruela símica. Estos tienen funciones esenciales; por lo que se incluyen en todas las variantes y virus emergentes. A pesar de las constantes mutaciones de esta familia, la sensibilidad y efectividad no deberían afectarse.
3		Maksyutov R et al(48). 2016	Species-specific differentiation of variola, monkeypox and varicella-zoster viruses by real-time PCR assay	F3L	-	-	-	Este estudio propuso un método simple, específico y rápido de detección viral entre patologías dermatológicas como: varicela, viruela símica y viruela. La utilización de los genes usados en el análisis del PCR elimina los falsos negativos y falsos positivos de los 34 especímenes estudiados.
4		Shchelkunov S et al (49) .2011	Species-specific identification of variola, cowpox, vaccinia and monkeypox viruses	B7R	50 copias/reacción	-	100%	La especificidad del estudio se determinó mediante ADN pertenecientes a 29 cepas de 6 especies de ortopoxvirus. El uso de los cebadores y los genes pertienentes, no mostraron reacción entre los distintos virus, teniendo una especificidad del 100%. La mínima cantidad de plásmidos detectados por el PCR para el virus de la viruela símica fue de 20 copias por reacción.
5		Kulesh D et al (50). 2004	Monkeypox virus detection in rodents using real-time 3'-minor groove binder TaqMan assays on the Roche LightCycler	• F3L • N3R	11-55 fg	-	-	Los resultados en animales para la detección del virus de la viruela símica sugieren una alta especificidad y sensibilidad. Se detectó la presencia de proteínas y/o ADN viral en al menos un tejido estudiado de los roedores.
6		Panning M et al(51). 2004	Rapid detection and Differentiation of Human Pathogenic Orthopox Viruses by a Fluorescence Resonance Energy Transfer Real-Time PCR Assay	Gen hemaglutida (HA)	25 copias/reacción	-	-	El gen HA es altamente específico para los orthopoxvirus, siendo indispensable para excluir diagnósticos diferenciales. Además, esto reduciría los costos y esfuerzos de los laboratorios para utilizar reacciones adicionales para la detección viral.
7	Amplificación mediada por recombinasa (RPA)	Mao L et al (37). 2022	Development and Characterization of Recombinase-Based Isothermal Amplification Assays (RPA/RAA) for the Rapid Detection of Monkeypox Virus	• Proteína de unión al factor de necrosis tumoral. • G2L • G2R	10^0 copias/reacción	-	-	Se desarrolló 3 métodos de detección isotérmica basados en recombinasa para la rápida detección del virus y se obtuvieron resultados de entre 20 – 30 minutos. El RPA en tiempo real y RAA-LFS presentaron una coincidencia del 100% de los resultados con el PCR en tiempo real en el diagnóstico del virus, mientras que el RPA-Cas12a tan solo un 83.3%.
8		Dede S et al (38). 2019	Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of Monkeypox virus	• Proteína de unión al factor de necrosis tumoral. • G2L • G2R	16 moléculas de ADN/ul.	95%	100%	Mediante el uso de RPA para el diagnóstico del virus en ambos clados, se detectaron en 7 minutos con una detección de 16 moléculas de ADN/ul. Al compararlo con el PCR en tiempo real, no se encontró correlación entre el tiempo mínimo de detección del RPA y el PCR, ya que el RPA detecta al virus más rápido que la PCR.
9	GeneXpert	Li D et al (40). 2017	Evaluation of the GeneXpert for Human Monkeypox Diagnosis	G2R	2.56 fg	98.8%	100%	El ensayo por GeneXpert mostró alta: especificidad, sensibilidad, VPP y VPN en pacientes con sospecha de la infección, independientemente de la muestra (vesícula o costra) e identificó al virus en cualquier etapa de erupción. Se usaron estas muestras ya que proporciona estabilidad y confiabilidad a los cartuchos. No obstante, las limitaciones del proyecto incluyeron algunas pruebas fallidas, debido a las partículas que se generaban por la pulverización de las costras. Así también, se requiere alta capacitaciones e interpretaciones de manuales del manejo del GeneXpert para optimizar su rendimiento. Otra importante limitación fue el costo de la máquina y cartuchos.
10	Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)	Yu C et al (44). 2022	Development of a Novel Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for a Rapid Detection of Monkeypox Virus Infections	N4R	2×10^0 copias/reacción	-	-	Se generaron resultados precisos en 30 minutos presentando una coincidencia del 100% en relación al PCR en tiempo real con una sensibilidad a 2×10^0 límites de detección. Además, el uso de PCR en tiempo real se encuentra limitado por la necesidad de equipos sofisticados y personal muy capacitado, limitándose en regiones con recursos limitados. Por esta razón, LAMP se considera como una alternativa necesaria para el control de la infección en regiones que tengan dificultades en la infraestructura de sus laboratorios.
11		Feng J et al (43). 2022	Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid and Visual Detection of Monkeypox Virus	• A27L • F3L	10^2 copias/reacción	-	-	Se seleccionaron los genes objetivos: A27L y F3L para la formación de cebadores. El gen F3L se utilizó para la detección en tiempo real, mientras que el A27L para mejorar la especificidad. Se detectó eficazmente al virus con una concentración de 20 copias y con el uso de cebadores A27L-1 y F3L-1. Se destaca la importancia de innovar con métodos más rápidos y sencillos para el control de enfermedades infecciosas; por esto, LAMP tiene ventajas, ya que es muy simple, específico, sensible y de bajo costo.
12		Lizuka I et al (52). 2009	Loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assay for monkeypox virus infection	D14L	$10^{2.4}$ copias/reacción	70 – 80%	100%	A pesar de las ventajas técnicas y económicas que proporciona LAMP sobre el PCR en tiempo real, la especificidad y sensibilidad fue de entre 70 – 80%. Sin embargo, el uso de LAMP facilita diferenciar los clados del virus de la viruela símica otorgando beneficios para el control de la enfermedad.

Tabla #2: Resultados de los genes diana y límite de detección con las distintas pruebas moleculares.

Fuente: Elaboración propia.

Discusión

Los estudios realizados por la amplificación mediada por recombinasa (RPA) fueron los artículos con los límites de detección más bajos que el resto de las técnicas y con los mismos genes diana estudiados: G2L, G2R y proteína de unión al factor de necrosis tumoral. Esto se suma a la rápida detección que varió entre 7 – 30 minutos (37,38). Los estudios hechos con PCR en tiempo real y LAMP utilizaron algunos genes diana que difirieron entre sí y con límites de detección ligeramente superiores. Sin embargo, destaca Yu C et al. (44) que con un límite de detección 2 x 10^0 copias/reacción y el gen diana N4R identificó la presencia del virus en 30 minutos y Panning M et al. (51) que reportó el gen hemaglutida con un límite de 25 copias/reacción, siendo altamente eficaz.

Estos estudios para detectar al virus de la viruela del mono u otros poxviridae, presentan distintos genes diana y límites de detección. Como se muestra en la tabla #2, en las pruebas de PCR en tiempo real, Mills M et al. (46) con un límite de detección de 65,6 copias/ml para los genes F3L y G2R, presentaron una alta sensibilidad y especificidad. Sin embargo, el gen G2R presentó una reacción de ciclos menor al del gen F3L, debido a la presencia de dos copias en la región ITR. Además, Kulesh D

et al. (50) con un límite de detección de 11 – 55 fg y Maksyutov R et al. (48) con un límite de detección no reportado, detectaron al gen F3L. Sugieren una alta especificidad y sensibilidad lo que eliminaría falsos positivos y negativos; incluso, detectando al virus en tejido de roedores.

En las pruebas por amplificación mediada por recombinasa (RPA), Dede S et al. (38) con un límite de detección de 16 moléculas de ADN/ul, siendo más rápido y eficaz que el estudio propuesto por Mao L et al. (37) con un límite de detección 10^0 copias/reacción, detectaron a los genes: G2L, G2R y proteína de unión al factor de necrosis tumoral. Dede S et al. (38) detectó al virus en 7 minutos, siendo más rápido que la prueba de PCR en tiempo real con una especificidad (100) % y sensibilidad (95 %) altas; mientras que Mao L et al. (37) tardó entre 20 – 30 minutos para conseguir el mismo resultado. No obstante, la coincidencia de la técnica de RPA-Cas12a con la de qPCR fue tan solo de un 83.3 %. Por otro lado, la prueba de GeneXpert propuesta por Li D et al. (40) que investigó el gen G2R con un límite de detección de 2.56 fg demostró fiabilidad en el estudio por un alto: sensibilidad (98.8 %), especificidad (100 %), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN), independientemente de la toma de la muestra (costra o vesícula) y de la etapa de erupción. No obstante, las dificultades para la toma de muestras y los altos costos de la prueba, sugieren una considerable limitación para el estudio.

En la prueba de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), los autores no coincidieron con el estudio de un mismo gen diana. Ergo, Yu C et al. (44) informó que el gen N4R con un límite de detección relativamente fiable de 2 x 10^0 copias/reacción, generó resultados precisos en 30 minutos con una tasa de coincidencia del 100 % con la prueba de qPCR. Además, este autor afirmó de las limitaciones que conlleva las máquinas de PCR, como: dificultades en zonas con recursos limitados y necesidad de personal muy capacitado. Feng J et al. (43) detectaron a los genes F3L y A27L con un límite de 10^2 copias/reacción. Afirmó que la utilización de cebadores indicó mayor sensibilidad y especificidad. Adicionalmente, destacó la importancia de innovar con más pruebas moleculares que puedan sustituir en ciertas situaciones a la prueba de PCR. Por último, Lizuka I et al. (52) con un límite de 10^2.4 copias/reacción, identificó al gen D14L; sin embargo, a pesar de las ventajas que afirma el autor de la técnica LAMP sobre la qPCR, la sensibilidad fue entre 70 – 80 %.

Panning M et al. (51) en su estudio identificó al gen hemaglutida con un límite de detección de 25 copias/reacción, el cual se presenta específicamente en la familia de los orthopoxvirida. Este permitiría la detección de estos virus, incluyendo al de la viruela símica, además de reducción de costos y reactivos, facilitando la exclusión de diagnósticos diferenciales. Shchelkunov S et al. (49) reportó al gen diana B7R para la identificación de: viruela símica, vaccinia, viruela bovina y el virus de la variola, con un límite de 50 copias/reacción. El estudio demostró que el uso de cebadores adecuados a este gen facilitó una especificidad del 100 % en la detección de estos virus. Por último, Luciani et al. (47) afirma haber realizado el primer ensayo que detecta a cualquier poxviridae gracias al gen D6R, el cual es un gen central que se encuentra en toda esta familia de virus. Con un límite de <1000 copias/reacción, este gen tiene una sensibilidad (100 %) y especificidad (99.8 %) facilitando el diagnóstico de estas infecciones, incluyendo nuevas cepas o virus emergentes.

Conclusiones

Se concluyó que las principales técnicas presentan diversos métodos de amplificación genómica para detectar al virus de la viruela del mono, estas se diferencian según: la temperatura utilizada, la computarización de la prueba, la cantidad de cebadores empleados e incluso las limitaciones de cada una; ergo, todas estas presentan una alta sensibilidad y especificidad en la identificación de los genes. Además, los estudios realizados en RPA que detectaron a los genes: proteína de unión al factor de necrosis tumoral, G2L y G2R, con los límites de detección más bajos, presentaron alta confiabilidad y rapidez en la identificación del virus. Por otra parte, los estudios recopilados sugieren que, a pesar del gen diana reportado, el límite de detección es indispensable para asegurar una correcta fiabilidad y reproducibilidad de la prueba, lo que puede ser importante para mejorar el tiempo del diagnóstico y asegurar un rápido cerco epidemiológico.

Revisión por pares

El manuscrito fue revisado por pares ciegos y fue aprobado oportunamente por el Equipo Editorial de la revista INSPILIP.

Disponibilidad de datos y materiales

Los datos que sustentan este manuscrito están disponibles bajo requisición al autor correspondiente.

Contribución de los autores

Las distintas fases de la investigación fueron realizadas por los autores, que contribuyeron de igual forma en todo el proceso.

Fuente de financiamiento

Se trabajó con recursos propios de los autores.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

Referencias Bibliográficas

1. Biscayart C, Ferrer MF, Otreras Á, López C, Lloveras S, Cunto E, et al. Viruela símica: zoonosis emergente con impacto global. ASEI. 2022;109:1–47.
2. Valdés Cabodevilla RC, Camejo Roviralta L, Concepción Parra W. Viruela del mono, nueva amenaza sanitaria. Monkeypox, a new health threat. Monkeypox, uma nova ameaça à saúde. Polo del Conocimiento. 2022;7:2108–26.
3. Viruela Símica–OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. 2022. Available from: https://www.paho.org/es/viruela-simica.
4. Prieto Alvarado FE, Muñoz Lozada CM, Madero Reales JA, Acevedo Duran YJ. Protocolo de Vigilancia de Viruela Símica-Monkeypox. Bogotá; 2022.
5. Sosa R. Viruela símica, un reto para la salud pública mundial. RevMedElectrón. 2022;
6. Mapa mundial del brote de viruela símica o del mono del 2022 | Viruela símica o del mono | Poxvirus | CDC [Internet]. 2022. Available from: https://espanol.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/response/2022/world-map.html.
7. Diagnóstico de laboratorio de Viruela del mono–OPS | Organización Panamericana de la Salud. 2022.
8. Torres HM. Current Options in the Diagnosis and Treatment of Monkeypox. Curr Fungal Infect Rep. 2022;16(4):234–9.
9. De Oliveira R, Da Silva T, Do Carmo D, Fernandes Rodrigues D, Da Silva L, Rodrigues S, et al. Molecular methods for diagnosis of monkeypox: A mini-review. 2022; Available from: https://doi.org/10.1101/2022.12.04.22283083.
10. Méndez Tibambre ME, Rodríguez Parra ZJ, Portela Dussan DD, Bustamante Restrepo MF, Aristizábal Gutiérrez FA. Método LAMP como alternativa diagnostica para la detección del virus SARS-CoV-2. RevColombCienc-QuimFarm. 2021;50(3):633–49.
11. Damon IK. Status of human monkeypox: clinical disease, epidemiology and research. Vaccine. 2011;29(SUPPL. 4):D54–9.
12. Dou YM, Yuan H, Tian HW. Monkeypox virus: past and present. World J Pediatr. 2022;1–7.
13. Bunge EM, Hoet B, Chen L, Lienert F, Weidenthaler H, Baer LR, et al. The changing epidemiology of human monkeypox—A potential threat? A systematic review. PLoS Negl Trop Dis . 2022;16(2).
14. Beer EM, Bhargavi Rao V. A systematic review of the epidemiology of human monkeypox outbreaks and implications for outbreak strategy. PLoS Negl Trop Dis. 2019;13(10).
15. Titanji BK, Tegomoh B, Nematollahi S, Konomos M, Kulkarni PA. Monkeypox: A Contemporary Review for Healthcare Professionals. Open Forum Infect Dis [Internet]. 2022 Jul 4 [cited 2022 Dec 1];9(7). Available from: https://academic.oup.com/ofid/article/9/7/ofac310/6615388.
16. McCollum AM, Damon IK. Human Monkeypox. Clinical Infectious Diseases. 2014;58(2):260–7.
17. Hughes AL, Irausquin S, Friedman R. The evolutionary biology of poxviruses. Infect Genet Evol. 2010;10(1):50–9.
18. Karagoz A, Tombuloglu H, Alsaeed M, Tombuloglu G, AlRubaish AA, Mahmoud A, et al. Monkeypox (mpox) virus: Classification, origin, transmission, genome organization,

antiviral drugs, and molecular diagnosis. J Infect Public Health. 2023 Apr 1;16(4):531–41.

19. Jones TC, Schneider J, Mühlemann B, Veith T, Beheim-Schwarzbach J, Tesch J, et al. Genetic variability, including gene duplication and deletion, in early sequences from the 2022 European monkeypox outbreak. bioRxiv. 2022;

20. Vera Villamar RA, Orellana Barros MR, Orellana Tapia BA, Yunga Ortiz DI. Más Vita. 2022. Viruela Símica: Revisión Bibliográfica.

21. Viruela del mono, el virus en investigación–Ministerio de Salud Publica y Bienestar Social. 2022.

22. Multi-country monkeypox outbreak in non-endemic countries–OMS | Organización Mundial de la Salud. 2022.

23. Patrono L V., Pléh K, Samuni L, Ulrich M, Röthemeier C, Sachse A, et al. Monkeypox virus emergence in wild chimpanzees reveals distinct clinical outcomes and viral diversity. Nat Microbiol. 2020;5(7):955–65.

24. Okyay RA, Bayrak E, Kaya E, Şahin AR, Koçyiğit BF, Taşdoğan AM, et al. Another Epidemic in the Shadow of Covid 19 Pandemic: A Review of Monkeypox. Eurasian J Med Oncol. 2022;6(2):95–9.

25. Russo AT, Grosenbach DW, Chinsangaram J, Honeychurch KM, Long PG, Lovejoy C, et al. An overview of tecovirimat for smallpox treatment and expanded anti-orthopoxvirus applications. Expert Rev Anti Infect Ther. 2020;19(3):331–44.

26. Sah R, Abdelaal A, Reda A, Katamesh BE, Manirambona E, Abdelmonem H, et al. Monkeypox and Its Possible Sexual Transmission: Where Are We Now with Its Evidence? Pathogens. 2022;11(8):924.

27. Clinical Recognition | Monkeypox | Poxvirus | CDC [Internet]. 2022. Available from: https://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/clinicians/clinical-recognition.html.

28. Soheili M, Nasseri S, Afraie M, Khateri S, Moradi Y, Maryam S, et al. J Pharm Pharm Sci. 2022. Monkeypox: Virology, Pathophysiology, Clinical Characteristics, Epidemiology, Vaccines, Diagnosis, and Treatments.

29. Hong KH, Kim GJ, Roh KH, Lee H, Park OK, Kim TS, et al. Guidelines for the Laboratory Diagnosis of Monkeypox in Korea. Ann Lab Med. 2023;43(2):137–44.

30. Singhal T, Kabra SK, Lodha R. Monkeypox: A Review. Indian J Pediatr. 2022;89(10):955–60.

31. Gul I, Liu C, Yuan X, Du Z, Zhai S, Lei Z, et al. Current and Perspective Sensing Methods for Monkeypox Virus. Bioengineering. 2022 Oct 1;9(10).

32. Laboratory testing for the monkeypox virus–OMS | Organización Mundial de la Salud. 2022 May.

33. Ishwara A, Pratap G. Characterization of Plant Viruses Methods and Protocols. 2020.

34. Pérez B, Mir M. Commercialized diagnostic technologies to combat SARS-CoV2: Advantages and disadvantages. Talanta. 2021;225:121898.

35. Fan X, Li L, Zhao Y, Liu Y, Liu C, Wang Q, et al. Clinical Validation of Two Recombinase-Based Isothermal Amplification Assays (RPA/RAA) for the Rapid Detection of African Swine Fever Virus. Front Microbiol. 2020 Jul 21;11:1696.

36. Lobato I, O'Sullivan C. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. Trends Analyt Chem. 2018;98:19.

37. Mao L, Ying J, Selekon B, Gonofio E, Wang X, Nakoune E, et al. Development and Characterization of Recombinase-Based Isothermal Amplification Assays (RPA/RAA) for the Rapid Detection of Monkeypox Virus. Viruses. 2022;14(10):2112.

38. Davi SD, Kissenkötter J, Faye M, Böhlken-Fascher S, Stahl-Hennig C, Faye O, et al. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of Monkeypox virus. Diagn Microbiol Infect Dis. 2019 Sep 1;95(1):41–5.

39. Tan M, Liao C, Liang L, Yi X, Zhou Z, Wei G.

Recent advances in recombinase polymerase amplification: Principle, advantages, disadvantages and applications. Front Cell Infect Microbiol. 2022;12:1019071.

40. Li D, Wilkins K, McCollum AM, Osadebe L, Kabamba J, Nguete B, et al. Evaluation of the genexpert for human monkeypox diagnosis. Am J Trop Med Hyg. 2017;96(2):405–10.

41. Lacayo De Santana AC, Rodríguez Cruz G, Pérez Z, Cornejo Vásquez C. Validez diagnóstica del GeneXpert para Mycobacterium tuberculosis y prueba de resistencia a rifampicina. 2021;

42. Escalante Maldonado O, Vidal Anzardo M, Donaires F, Solis Sanchez G, Gallesi I, Pampa Espinoza L, et al. Estandarización y validación de una prueba molecular RT-LAMP in the house para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Peru Med Exp Salud Pública. 2021.

43. Feng J, Xue G, Cui X, Du B, Feng Y, Cui J, et al. Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid and Visual Detection of Monkeypox Virus. Microbiol Spectr. 2022;10(5).

44. Yu C, Zuo L, Miao J, Mao L, Selekon B, Gonofio E, et al. Development of a Novel Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for the Rapid Detection of Monkeypox Virus Infections. Viruses. 2022;15(1):84.

45. Soroka M, Wasowicz B, Rymaszewska A. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR? Cells. 2021 Jul 29;10(8):1931.

46. Mills MG, Juergens KB, Gov JP, McCormick CJ, Sampoleo R, Kachikis A, et al. Evaluation and clinical validation of monkeypox (mpox) virus real-time PCR assays. J Clin Virol. 2023;159:105373.

47. Luciani L, Inchauste L, Ferraris O, Charrel R, Nougairède A, Piorkowski G, et al. A novel and sensitive real-time PCR system for universal detection of poxviruses. Scientific Reports 2021 11:1. 2021;11(1):1–6.

48. Maksyutov R, Gavrilova E, Shchelkunov S. Species-specific differentiation of variola, monkeypox, and varicella-zoster viruses by multiplex real-time PCR assay. J Virol Methods. 2016 Oct 1;236:215–20.

49. Shchelkunov S, Shcherbakov D, Maksyutov R, Gavrilova E. Species-specific identification of variola, monkeypox, cowpox, and vaccinia viruses by multiplex real-time PCR assay. J Virol Methods. 2011 Aug 1;175(2):163–9.

50. Kulesh DA, Loveless BM, Norwood D, Garrison J, Whitehouse CA, Hartmann C, et al. Monkeypox virus detection in rodents using real-time 3′-minor groove binder TaqMan® assays on the Roche LightCycler. Laboratory Investigation. 2004;84(9):1200–8.

51. Panning M, Asper M, Kramme S, Schmitz H, Drosten C. Rapid Detection and Differentiation of Human Pathogenic Orthopox Viruses by a Fluorescence Resonance Energy Transfer Real-Time PCR Assay. Clin Chem. 2004;50(4):702–8.

52. Iizuka I, Saijo M, Shiota T, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, et al. Loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assay for monkeypox virus infections. J Med Virol. 2009 Jun;81(6):1102–8.