

RedeVírus MCTI

Protocolo para pesquisa molecular de Monkeypox vírus

Dra. Karine Lima Lourenço - CTVacinas UFMG
Dr. Alex Fiorini de Carvalho - CTVacinas UFMG
Dr. Flávio Guimarães da Fonseca - CTVacinas UFMG
Dra. Giliane Trindade – Laboratório de Virus- UFMG
Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes – CTVacinas UFMG
Coordenadora da RedeVirus MCTI em Diagnóstico



Face à disseminação do vírus da varíola símia, ou Monkeypox, e a necessidade de estabelecer protocolos de diagnóstico molecular e ampliar a testagem em território nacional, auxiliando os laboratórios de pesquisa no país, O CT Vacinas UFMG, em parceria com o Laboratório de Virologia Clínica e Molecular (LVCM) da USP e com apoio da RedeVírus MCTI em Diagnóstico, padronizou um protocolo de PCR em tempo real para Monkeypox vírus. Esse contém iniciadores para qPCR específicos para MPXV West African, MPXV Congo Basin e MPXV generic (Tabela 1). As reações de qPCR foram desenhadas e realizadas de acordo com a metodologia descrita por Yu Li e colaboradores (2010) (Tabelas 2 e 3). Além disso, foram desenhados iniciadores para sequenciamento por Sanger do genoma do vírus, conforme apresentado nas Figuras 1 e 2.

1. Protocolo

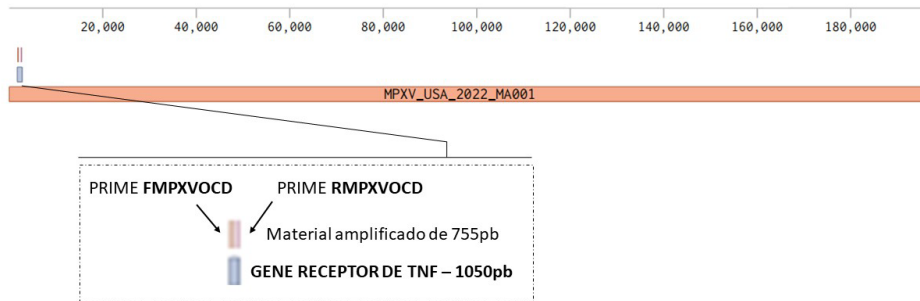
1.1 Primers

Tabela 1 - Primers para diagnóstico molecular (qPCR e PCR/SANGER) para MPXV West African, MPXV Congo Basin e MPXV generic. Abreviações: West African forward (FMPXVOCD), West African reverse (RMPXVOCD), Congo Basin forward (FMPXVCNT) e Congo Basin reverse (RMPXVCNT). Primers e probes foram encomendados junto à EXXTEND.

Nome	Sequencia	Reação	Tamanho amplicon (PCR)
FMPXVOCD	TCGTGTCCTCCGGAACTTA	PCR/SANGER	755
RMPXVOCD	ACGCTAGATAGACAGTCGCC	PCR/SANGER	
FMPXVCNT	ATGAAGGTGGAGAGCGTGA	PCR/SANGER	647
RMPXVCNT	AGCCGCTAGAAGTTTTCCGT	PCR/SANGER	
West Africa - forward	CACACCGTCTCTCCACAGA	qPCR	Não se aplica
West Africa - reverse	GATACAGGTTAATTTCCACATCG	qPCR	
West Africa - probe	FAM AACCCGTCGTAACCAGCAATACATTT	qPCR	
MPXV Congo Basin -fw	TGTCTACCTGGATACAGAAAGCAA	qPCR	
MPXV Congo Basin -rv	GGCATCTCCGTTTAATACATTGAT	qPCR	
MPXV Congo Basin -probe	FAM CCCATATATGCTAAATGTACCGGTACCGGA	qPCR	
MPXV generic -fw	GGAAAATGTAAGACAACGAATACAG	qPCR	
MPXV generic -rv	GCTATCACATAATCTGGAAGCGTA	qPCR	
MPXV generic -probe	FAM AAGCCGTAATCTATGTTGTCTATCGTGTC	qPCR	

1.2 Esquema de estratégia PCR/SANGER

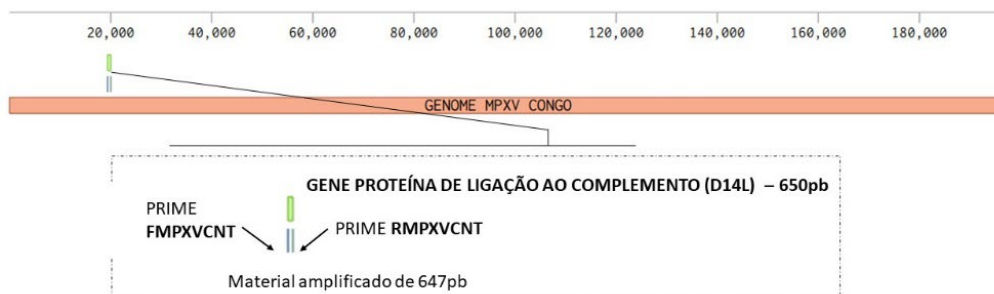
MPXV West African strain



* Gene upstream: Cop-C23L
Gene downstream: Ankyrin (Cop-C19L)

Figura 1: Representação da estratégia para PCR/SANGER West African strain. Primers específicos foram desenhados para amplificação de um amplicon de 755pb correspondente a parte do gene do receptor de TNF.

MPXV Congo Basin strain



* Gene upstream: D13L
Gene downstream: D19L

Figura 2: Representação da estratégia para PCR/SANGER Congo Basin strain. Primers específicos foram desenhados para amplificação de um amplicon de 647pb correspondente a parte do gene da proteína de ligação ao complemento.



1.3 Reação qPCR

Tabela 2: Montagem da Reação de qPCR

Método	West Africa	MPXV Congo Basin	MPXV Generic
Tampão Master Mix biorad	10 µL	10 µL	10 µL
Primer F (0.4 µmol/L)	0,40 µL	0,40 µL	0,40 µL
Primer R (0.4 µmol/L)	0,40 µL	0,40 µL	0,40 µL
Sonda (200 nmol/L)	0,40 µL	0,40 µL	0,40 µL
Enzima	0,30 µL	0,30 µL	0,30 µL
Água ultrapura	6,50 µL	6,50 µL	6,50 µL
Amostra DNA	2 µL	2 µL	2 µL
Volume por poço	20 µL	20 µL	20 µL

Tabela 3: Temperatura/tempo e números de ciclos para qPCR

Ciclo:	Temperatura °C	Duração	Ciclos
<i>MPXV Generic</i>	95	6 min	1
<i>MPXV Congo Basin</i>	95	15 seg	45
	60	1 min	
Ciclo:	Temperatura °C	Duração	Ciclos
<i>West Africa</i>	95	6 min	1
	95	15 seg	45
	62	1 min	

1.4 Validação

A validação da qPCR foi realizada no CT VACINAS utilizando-se uma amostra de vírus propagada no ICB/UFMG pelo Laboratório de Vírus, amostra esta proveniente de isolado humano, cedida pela FUNED. Foi adicionado ao meio de transporte viral (MTV) 30 µL da referida amostra, somando 300 µL de amostra e MTV. O material extraído apresentou amplificação com os primers e probes MPXV West Africa e MPXV generic e (Figura 3 e 4), mas não amplificou nas reações com MPXV Congo Basin (Figura 5).



A mesma amostra foi submetida a microscopia eletrônica, realizada pelo Laboratório de Vírus da UFMG, no Centro de Microscopia da UFMG, confirmando a presença de vírus com morfologia característica de Monkeypox.

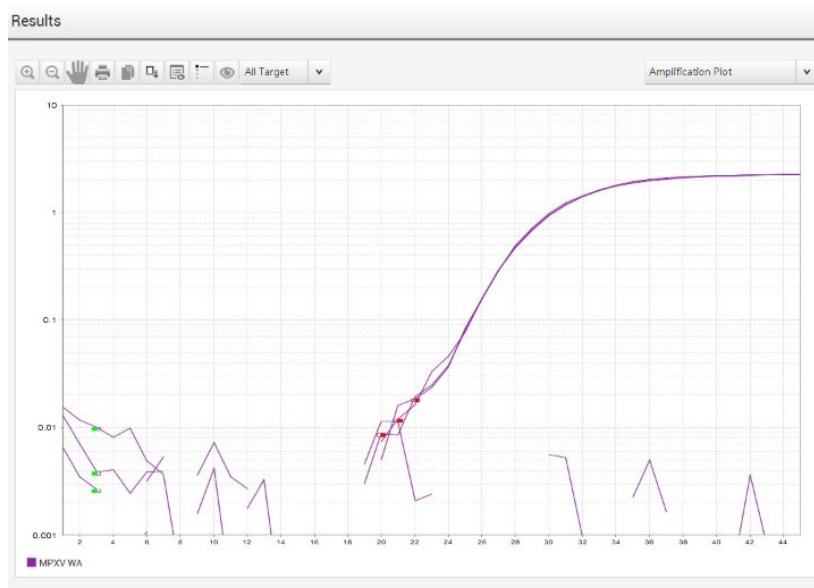


Figura 3: Validação da amostra por qPCR, o material extraído amplificou no Cq 26,3 com primers para MPXV West Africa.

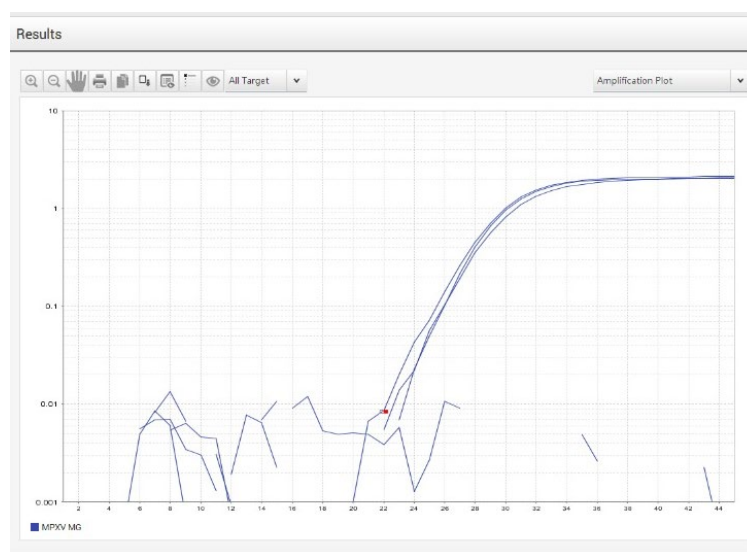


Figura 4: Validação da amostra por qPCR, o material extraído amplificou no Cq 26,7 com os primers para MPXV generic.



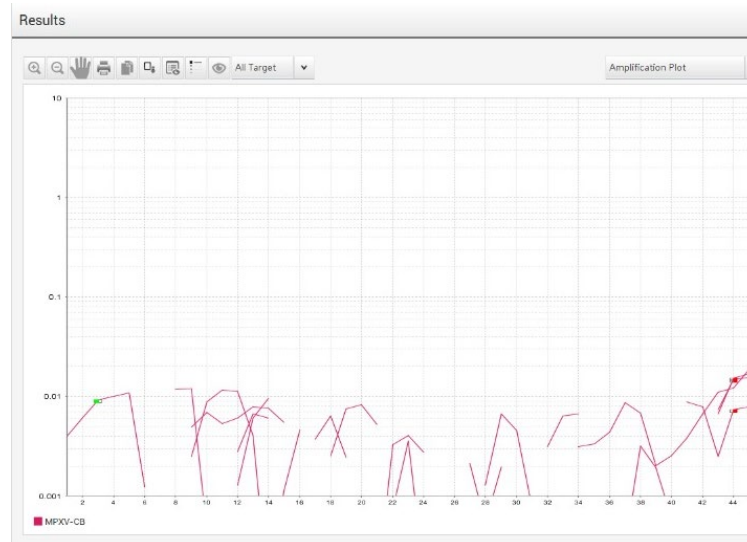


Figura 5: Validação da amostra por qPCR, o material extraído não apresentou amplificação om os primers para MPXV Congo Basin.

Em paralelo, os mesmos reagentes foram usados para amplificação por qPCR em material oriundo de isolado viral, pela Dr. Danielle Bruna Durigon no LVCM-USP, confirmando a capacidade dos reagentes e dos protocolos testados de detectar Monkeypox de forma sensível e específica.

A equipe do CTVACINAS UFMG se coloca à disposição para maiores informações que se fizerem necessárias.

Referências

Li, Y., Zhao, H., Wilkins, K., Hughes, C., & Damon, I. K. (2010). Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA. *Journal of virological methods*, 169(1), 223-227.

Contato e Informações:

ctvacinas@gmail.com

www.ctvacinas.ufmg.br (31) 3401-1226

