

Diretrizes laboratoriais para triagem e diagnóstico da infecção por MPXV

27 August 2024

Este documento é uma atualização das Diretrizes laboratoriais para triagem e diagnóstico da infecção por MPXV da Organização Pan-Americana da Saúde publicadas em 15 de agosto de 2024. O documento foi modificado para incluir a recomendação mais recente sobre o envio de amostras clínicas de casos suspeitos ou confirmados de varíola dos macacos.

Este documento é baseado na orientação provisória da Organização Mundial da Saúde sobre testes laboratoriais para o vírus da varíola dos macacos (mpox), 10 de maio de 2024, e visa fornecer orientação aos Laboratórios Nacionais de Referência sobre a detecção do mpox.

Monkeypoxvirus (MPXV) é um vírus de DNA de fita dupla, membro do gênero *Orthopoxvirus* dentro da família *Poxviridae*. Os poxvírus causam doenças em humanos e em muitos outros animais; A infecção geralmente resulta na formação de lesões, nódulos cutâneos ou erupção cutânea disseminada. Outras espécies patogênicas para os humanos incluem o vírus *da varíola bovina* e o vírus *da varíola* (que causa a varíola, que foi erradicada). O vírus *Vaccinia* também é um OPXV que tem sido usado como vacina atenuada e foi uma ferramenta fundamental para a erradicação da varíola alcançada em 1980. Todos os orthopoxvirus (OPXV) são antigenicamente relacionados.

MPXV recebe esse nome devido à detecção inicial em colônias de macacos, embora possa ser encontrada principalmente em roedores; no entanto, o reservatório específico não foi determinado. Existem dois grupos genéticos (*clados*) de MPXV agora chamados Clado I (antigo clado da Bacia do Congo) e Clado II (antigo clado da África Ocidental). O clado II consiste em dois subclados, IIa e IIb. O surto de 2022/2023 em humanos que atingiu vários países foi associado à disseminação de um vírus do clado IIb e foi reconhecido como uma emergência de saúde pública de interesse internacional (PHEIC, da sigla em inglês) de 23 de julho de 2022 a 11 de maio de 2023. O Clado IIb continua a circular pelo mundo e até hoje é o único detectado nas Américas.

Em dezembro de 2022, a República Democrática do Congo (RDC) declarou um surto nacional de mpox em humanos e, desde setembro de 2023, o surto que afetou a província de Kivu do Sul se espalhou e afetou outras províncias da RDC. Além disso, no último mês, quatro novos países da África Oriental (Burundi, Quênia, Ruanda e Uganda) relataram seus primeiros casos de mpox. Todos os casos sequenciados até o momento na África Oriental e Central pertencem a um novo subclado do clado I, clado Ib. Por outro lado, a Costa do Marfim está passando por um surto mpox ligada ao clado II MPXV e a África do Sul relatou dois outros casos confirmados. Em 14 de agosto de 2024, o aumento da mpox na RDC e em outros países da África foi determinado como constituindo uma PHEIC. Em 15 de agosto de 2024, o primeiro caso de clado I fora da região africana foi detectado na Suécia

Após a incubação que pode variar de 6 a 16 dias, a apresentação típica da mpox começa com um curto período prodromico febril, seguido pelo desenvolvimento progressivo de uma erupção cutânea clássica com lesões endurecidas e umbilicadas (deprimidas centralmente), começando na cabeça ou na face e progredindo para as extremidades e tronco. Todas as lesões progridem no mesmo estágio, desde máculas, pápulas, vesículas, pústulas e, eventualmente, crostas que secam e caem após duas a quatro semanas. Muitas vezes há enantema (feridas ou úlceras nas membranas mucosas) na boca e as lesões podem afetar os olhos e/ou a área genital.

Devido à variedade de condições que causam erupções cutâneas e porque a apresentação clínica pode ser mais atípica neste surto, pode ser difícil diferenciar a mpox com base apenas na apresentação clínica. Portanto, a decisão de realizar um teste laboratorial deve ser baseada em fatores clínicos e epidemiológicos, atrelados a uma avaliação da probabilidade de infecção. Qualquer pessoa que atenda à definição de caso suspeito deve receber um teste.

Dada a detecção atual de MXPV em vários países, qualquer caso que atenda à definição de caso suspeito deve ser testado. Nesse sentido, a Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS) recomenda que os Estados Membros garantam a identificação oportuna de casos suspeitos, a coleta de amostras e a implementação de protocolos de detecção molecular nos Laboratórios Nacionais de Referência, de acordo com a capacidade existente. Quando necessário, deve-se considerar o envio de amostras para um Laboratório de Referência em nível regional ou global. Entre em contato com o Escritório Regional da OPAS para obter orientação sobre os procedimentos.

COLETA E GERENCIAMENTO DE AMOSTRAS

Procedimentos de biossegurança

O uso de procedimentos operacionais padrão (POPs) apropriados deve ser garantido, e o pessoal do laboratório deve ser treinado no uso adequado de equipamentos de proteção individual (EPI), incluindo avental antifluido descartável, luvas de látex, óculos de proteção ou cobertura facial completa, boné, proteção respiratória e coberturas de sapatos, bem como para posterior descarte dos mesmos. Além disso, o pessoal deve ser treinado na coleta, armazenamento, embalagem e transporte de amostras.

Gestão de Riscos Biológicos

Medidas devem ser tomadas para minimizar o risco de transmissão laboratorial, com base em uma **avaliação de risco em nível institucional**, para testar amostras clínicas de rotina de pacientes suspeitos ou confirmados de mpox. Isso pode incluir, mas não se limita a definir um número limitado de funcionários de laboratório que processam amostras, com experiência e competência comprovadas, usando EPI apropriado, usando precauções padrão rigorosamente aplicadas e evitando quaisquer procedimentos que possam gerar aerossóis infecciosos.

Desinfetantes eficazes incluem 0,5% de compostos de amônio quaternário (ou 200 ppm) ou desinfetantes à base de cloro (0,5%). A adesão estrita às diretrizes de prevenção e controle de infecções deve ser garantida durante a coleta e manuseio de amostras (o manejo clínico e as orientações de prevenção e controle de infecções estão sendo desenvolvidos).

Recomenda-se que todo o manuseio de amostras de casos suspeitos, prováveis ou confirmados de mpox em laboratório seja realizado de acordo com uma abordagem baseada em risco. Cada laboratório deve realizar uma avaliação de risco local (ou seja, institucional).

Ao manusear amostras biológicas em laboratório, os requisitos básicos de um ambiente de nível 2 de biossegurança devem ser atendidos e medidas de controle aprimoradas com base na avaliação de risco local devem ser aplicadas.

Uma infecção por MPXV pode ocorrer em laboratório por via respiratória durante a fase de processamento de amostras de material contaminado ou por práticas inadequadas. Portanto, medidas de biossegurança aprimoradas são recomendadas além dos requisitos básicos, incluindo os seguintes, para ensaios de diagnóstico sem espalhar o vírus:

- As amostras de pacientes com suspeita de infecção por MPXV devem ser manuseadas em uma cabine de biossegurança Classe II (de acordo com o manual de manutenção laboratorial da OPAS) ou certificada, antes da inativação da amostra. Amostras devidamente inativadas não requerem o uso da cabine de biossegurança.
- A equipe do laboratório deve usar EPI apropriado, especialmente para manusear amostras antes da inativação.
- Quando o uso de uma centrífuga é necessário para um procedimento, devem ser usados recipientes de segurança ou rotores selados.

Devem ser consideradas medidas de controle adicionais para procedimentos específicos, incluindo procedimentos de formação de aerossóis, em conformidade com a avaliação local dos riscos. Para obter mais informações sobre os requisitos básicos de biossegurança e medidas de controle aprimoradas, consulte a quarta edição do Manual de Biossegurança da OMS.

Tipos de amostra

O tipo de amostra recomendado para confirmação laboratorial de mpox é o material de lesão cutânea, que inclui:

- Swab da superfície e/ou exsudato da lesão,
- Bordas superiores de mais de uma lesão (superfície das lesões), ou
- Crostas de lesões.

Swab de lesões, crostas e fluidos vesiculares não devem ser misturados no mesmo tubo.

Após uma limpeza cuidadosa com soro fisiológico ou PBS estéril, a lesão deve ser esfregada vigorosamente para garantir que material suficiente seja coletado para a coleta de DNA viral. Não há necessidade de remover as bordas superiores ou perfurar as lesões antes de esfregar. Os swabs podem ser coletados em tubos secos ou em tubos com meios de transporte viral (MTV). Embora a coleta de swabs de lesões geralmente seja suficiente para o teste, a coleta de crostas ou cascas pode ser útil, especialmente se a progressão do caso estiver avançada. Nesse caso, as medidas de prevenção de ferimentos por perfurocortantes devem ser rigorosamente seguidas. Duas lesões do mesmo tipo devem ser coletadas em um único tubo, de preferência de locais diferentes do corpo e com aparência distintas.

Além de uma amostra da lesão, recomenda-se a coleta de um swab orofaríngeo. No entanto, os dados sobre a utilidade desse tipo de amostra para o diagnóstico de mpox são limitados, portanto, uma amostra negativa de swab de garganta deve ser interpretada com cautela.

Como o surto atual ainda está sob investigação, a coleta de outros tipos adicionais de amostras para fins de pesquisa pode ser considerada se permitida pelo conselho de revisão ética apropriado, e há experiência médica e laboratorial suficiente para sua coleta, manuseio e armazenamento seguros. Estes podem incluir urina, sêmen, swab retal e/ou genital na indicação com base na apresentação clínica, incluindo a localização das lesões.

Armazenamento de amostras

As amostras devem ser refrigeradas (2 a 8°C) ou congeladas (-20°C ou menos) dentro de uma hora após a coleta. Se o transporte exceder 7 dias para a amostra a ser analisada, as amostras devem ser armazenadas a -20°C ou menos.

Recomenda-se o armazenamento de amostras a longo prazo (>60 dias a partir da coleta) a -70°C. Ciclos repetidos de congelamento e descongelamento devem ser evitados, pois podem reduzir a qualidade das amostras.

Outros tipos de amostra

O tipo de amostra adicional (não destinado ao diagnóstico de rotina e não precisa ser coletada fora dos ambientes de pesquisa) é (1) sangue em EDTA que pode ser usada para apoiar a detecção de MPXV, mas pode não conter um alto nível de vírus como encontrado em amostras de lesões, uma vez que qualquer viremia ocorre no início do curso da infecção, geralmente no período prodrômico e antes que as lesões cutâneas se manifestem; (2) biópsia da lesão durante o estágio macular, que deve ser considerada apenas quando existe uma indicação clínica e só deve ser realizada por pessoal devidamente treinado.

ENVIO DE AMOSTRAS

As amostras devem ser armazenadas refrigeradas ou congeladas dentro de uma hora após a coleta e transportadas para o laboratório o mais rápido possível após a coleta. O manuseio e armazenamento corretos das amostras durante o transporte são essenciais para um diagnóstico preciso.

O transporte de amostras deve estar em conformidade com os regulamentos nacionais e/ou internacionais aplicáveis, incluindo os Regulamentos Modelo das Nações Unidas sobre Recomendações para o Transporte de Substâncias Perigosas e outros regulamentos aplicáveis, dependendo do modo de transporte utilizado.

Para o transporte internacional por via aérea, as amostras clínicas de casos suspeitos prováveis ou confirmados de mpox pode ser enviado como "Categoria B, substância biológica – UN3373".

Isolados virais em cultura celular devem ser transportadas como "Categoria A, substância infecciosa que afeta humanos – UN2814" (não é recomendado tentar isolamento viral).

Todos os espécimes a serem transportados devem ser embalados com um sistema de tripla embalagem, devidamente rotulados e com documentação adequada. O envio aéreo requer um transportador certificado em mercadorias perigosas. Para obter informação sobre os requisitos de envio de substâncias infecciosas, consulte as Diretrizes da OMS sobre regulamentações para o transporte de substâncias infecciosas 2023-2024 (disponível em <https://www.who.int/publications/i/item/789240089525>).

Para remessas internacionais, entre em contato com o Grupo de Resposta de Laboratórios da OPAS por e-mail ricoj@paho.org e/ou laboratoryresponse@paho.org

TESTES DE LABORATÓRIO

Os testes para a presença de MPXV devem ser realizados em laboratórios devidamente equipados por pessoal treinado nos procedimentos técnicos e de biossegurança relevantes. Medidas devem ser tomadas para minimizar o risco de transmissão em laboratório com base na avaliação de risco ao testar amostras clínicas de rotina de pacientes confirmados ou suspeitos de mpox.

O ISOLAMENTO VIRAL EM CULTURA NÃO É RECOMENDADO

Os países sem um protocolo de diagnóstico molecular implementado para a detecção de MPXV devem enviar amostras clínicas suspeitas (definição de caso estritamente ajustada) a um laboratório de referência designado pela OPAS. Para obter assistência, entre em contato com a Equipe de Resposta Laboratorial da OPAS (ricoj@paho.org).

Testes Moleculares

A confirmação da infecção por MPXV é baseada em testes de amplificação de ácido nucleico (NAATs), usando reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional ou em tempo real, para a detecção de sequências específicas de DNA viral. A PCR pode ser usada sozinha ou em combinação com o sequenciamento de acordo com os algoritmos sugeridos.

Extração de DNA

O DNA pode ser extraído das amostras mencionadas acima usando qualquer protocolo ou kit de extração padrão. Em geral, a etapa de lise na extração de DNA inativa qualquer vírus vivo. Por esse motivo, recomenda-

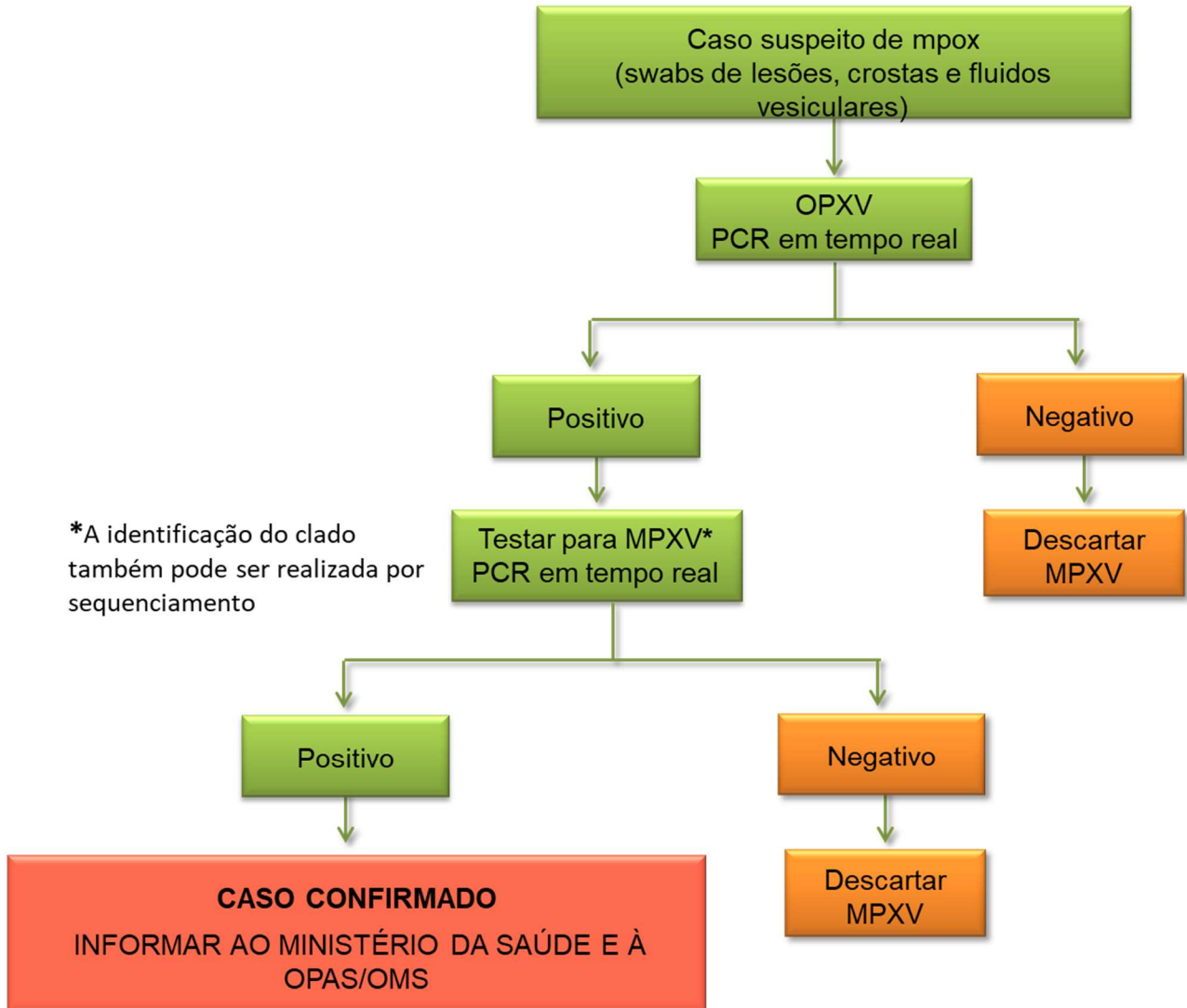
se que a etapa de lise seja realizada dentro de um gabinete de biossegurança. Para amostras de crosta de lesões, o kit de extração de DNA para amostras de tecido deve ser usado para garantir a lise adequada da amostra.

Protocolos de PCR

Vários grupos desenvolveram protocolos de PCR para a detecção de ORXV ou MPXV, bem como protocolos para diferenciar e especificar a confirmação dos clados I e II de MPXV. Dependendo do protocolo disponível, dois algoritmos podem ser usados para pesquisa de vírus e detecção específica.

Algoritmo 1

Neste primeiro algoritmo, o PCR detecta qualquer OPXV, mas não identifica qual é a espécie viral. As amostras positivas são então caracterizadas por PCR ou sequenciamento para detectar especificamente MPXV (veja abaixo, Algoritmo 1). Embora seja preferível realizar o teste confirmatório específico para MPXV, a detecção positiva usando o ensaio de PCR OPXV é considerada suficiente para a confirmação laboratorial de casos suspeitos em países onde não há outros orthopoxvirus circulando.

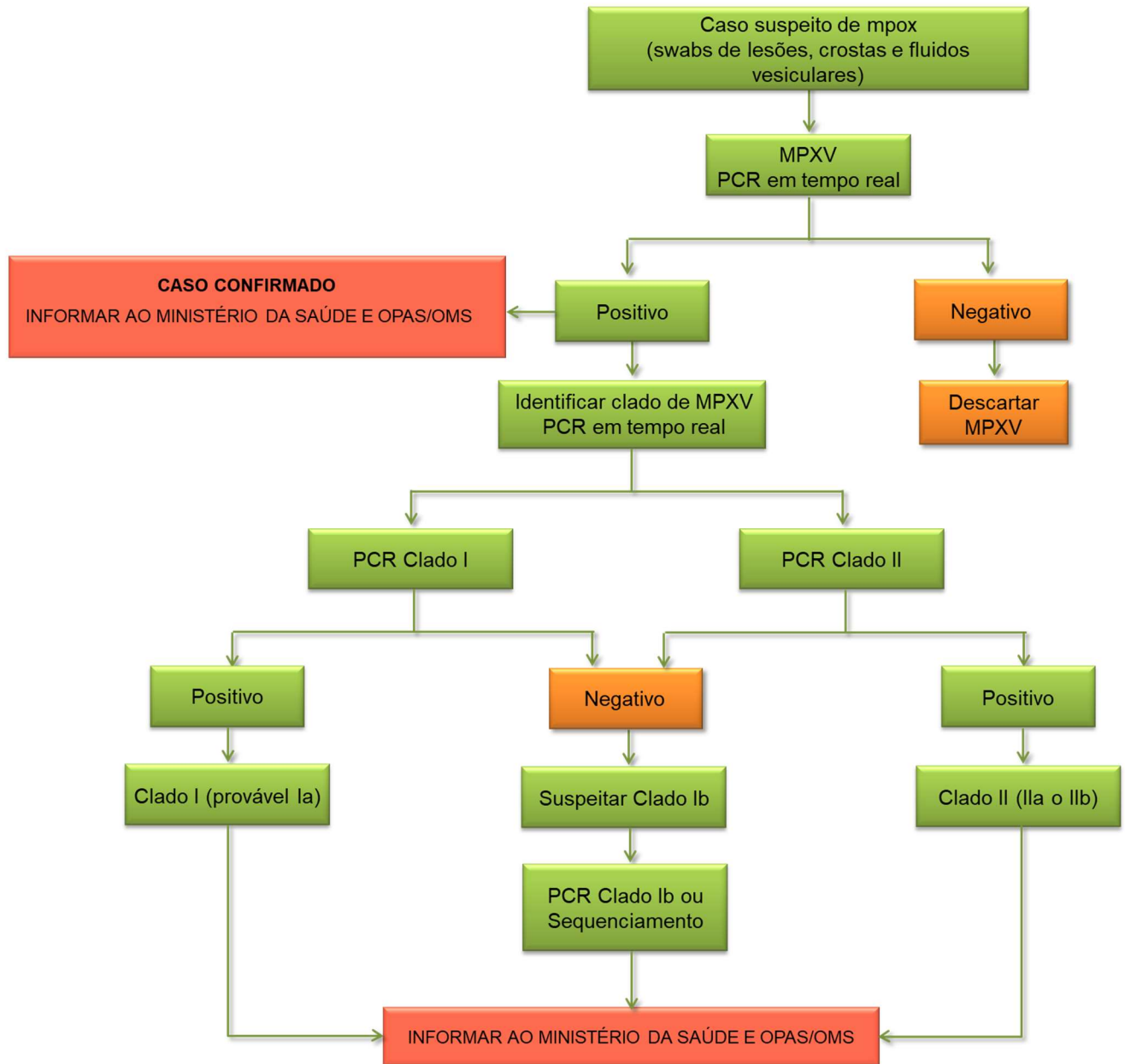


Algoritmo 2

O segundo algoritmo (recomendado) é baseado na detecção genérica inicial de MPXV (confirmando a etiologia), seguida pela diferenciação específica de clados usando ensaios de PCR (veja abaixo, Algoritmo 2). Desde 2022, a OPAS trabalha com os Estados Membros na implementação deste algoritmo de detecção molecular MPXV. O protocolo recomendado (Li *et al.*, *Journal of Virological Methods*. 2010. **169**, 223–7) foi publicado e está disponível no seguinte link: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.07.012>. En el presente documento se adjunta un protocolo de trabajo (Anexo 1).

Este protocolo é baseado na identificação inicial do MXPV por meio de uma PCR genérica em tempo real que detecta todas as cepas de MPXV, incluindo os clados Ia, Ib, IIa e IIb. Se esta PCR genérica for positiva, ela é seguida por uma reação direcionada subsequente para 2 alvos adicionais, um para o clado I e outro para o clado II. A PCR específica para o clado II pode detectar os clados IIa e IIb vírus. No entanto, os dados de sequenciamento do atual surto do clado Ib na Região da África mostram que uma deleção nesses vírus resulta em uma perda de detecção quando utilizada a PCR específica para o clado I. Por esse motivo, ao usar o protocolo recomendado, um resultado positivo com PCR genérico seguido de um resultado negativo para ambos os clados, I e II, poderia indicar a presença de um vírus pertencente ao clado Ib. Este achado deve ser confirmado por sequenciamento. Em alternativa, estão atualmente disponíveis novos ensaios para a detecção do vírus do clado Ib (Incluindo, Leonard *et al.*, *Euro Surveill*. 2024. **29**:pii=2400486. Disponible en: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2024.29.32.2400486>) (ver abaixo, Algoritmo 2).

Reagentes (primers, sondas e controles positivos) para esses ensaios estão sendo distribuídos pela OPAS/OMS em toda a região. Além disso, protocolos específicos para o clado Ib estão sendo avaliados e os reagentes correspondentes serão distribuídos dependendo dos resultados da validação.



Sequenciamento

Os dados de sequenciamento genômico são úteis para a identificação de clados e subclados MPXV. Eles também podem ser usados para monitorar o impacto potencial da evolução do vírus no desempenho dos ensaios de PCR. Eles também podem fornecer informações valiosas para ajudar a entender as origens, epidemiologia e características do vírus, por exemplo, se os casos surgem de uma única introdução ou de várias introduções de outros locais. Os países e laboratórios são incentivados a compartilhar suas sequências, incluindo dados brutos, sempre que possível em tempo hábil por meio de bancos de dados disponíveis publicamente.

Diagnóstico diferencial

É importante considerar outras causas potenciais de lesões cutâneas discretas ou erupção cutânea disseminada e outras etiologias para lesões cutâneas de aparência semelhante em diferentes estágios de desenvolvimento, incluindo vírus herpes simplex, vírus varicela zoster, vírus do molusco contagioso, enterovírus, sarampo, escabiose, zika, chikungunya, dengue, *Treponema pallidum* (sífilis), infecções bacterianas da pele, alergias a medicamentos, parapoxvírus e cancroides, entre outros.

Amostras, material de coleta e temperatura de armazenamento para detecção de MPXV e diagnóstico diferencial

Tipo de espécime	Materiais de coleta*	Temperatura de armazenamento	Finalidade da coleta
Material de lesão cutânea , incluindo: <ul style="list-style-type: none"> • Swab e/ou exsudato da lesão • Cascas das lesões • Crostas de lesões 	Swabs de Dacrón ou poliéster com MTV ou swab seco	Refrigerar (2 a 8°C) ou congelar (-20°C ou menos) dentro de uma hora da coleta; -20°C ou menos depois de 7 dias	Recomendado para diagnóstico
Swab orofaríngeo	Swab de Dacrón ou poliéster com MTV ou swab seco	Refrigerar (2 a 8°C) ou congelar (-20°C ou menos) dentro de uma hora da coleta; -20°C ou menos depois de 7 dias	Recomendado para diagnóstico, se possível, além do material da lesão cutânea
Soro	Tubos separadores de soro	Refrigerar (2 a 8°C) ou congelar (-20°C ou menos) dentro de uma hora da coleta; -20°C ou menos depois de 7 dias	A ser considerado para sorologia ou para Apoiar o diagnóstico ou a investigação (segundo as diretrizes éticas)
Plasma	Tubo de coleta com EDTA	Refrigerar (2 a 8°C) ou congelar (-20°C ou menos) dentro de uma hora da coleta; -20°C ou menos depois de 7 dias	A ser considerado para sorologia ou para apoiar o diagnóstico ou a investigação (segundo as diretrizes éticas)

*Além dos materiais de coleta específicos listados, outros materiais e equipamentos necessários incluem: recipientes de transporte e sacos de coleta de amostras e embalagens triplas, refrigeradores e compressas frias ou gelo seco, equipamentos de coleta de sangue estéril (por exemplo, agulhas, seringas e tubos), etiquetas e marcadores permanentes, EPI e materiais de descontaminação de superfície.

Expansão da rede de diagnóstico

O teste centralizado do MPXV pode levar a tempos de resposta mais longos, dependendo do número de amostras recebidas, do sistema de transporte de amostras, da capacidade do laboratório nacional e da integração dos sistemas de vigilância e informação. Portanto, para garantir a confirmação oportuna do caso, rastreamento de contatos e implementação de medidas de saúde pública, a descentralização da PCR MPXV pode ser necessária. Ao planejar a expansão da rede de laboratórios do MPXV, é importante considerar:

- Coordenação e supervisão da rede pelo Laboratório Nacional de Saúde Pública
- Regulamentos nacionais e locais
- Requisitos de biossegurança e biocustódia
- Treinamento de pessoal
- Controle de qualidade
- Ensaios de PCR a serem usados

O protocolo *in house* sugerido (Li et al., *Journal of Virological Methods*. 2010. **169**, 223–7, ver acima) pode ser implementado com base na capacidade laboratorial e é recomendado como protocolo de referência.

Além disso, estão disponíveis vários kits comerciais, incluindo (mas não exclusivamente) os kits mencionados no anexo 2. **No entanto, até o momento, a OPAS/OMS não recomenda nenhum kit comercial e qualquer kit deve ser usado somente após verificação/validação adequada em estreita colaboração com os laboratórios nacionais de saúde pública.** É importante monitorar o impacto potencial da evolução do MPXV no desempenho desses kits, pois as mutações (incluindo deleções) podem afetar tanto os kits genéricos quanto os kits específicos para MPXV.

TESTES EM ANIMAIS

A mpox é uma doença zoonótica e é provável que, em áreas endêmicas, pequenos mamíferos atuem como reservatórios virais. Um grande número de espécies animais é suscetível à infecção por MPXV, incluindo esquilos, ratos do gênero *Cricetomys*, cães, ouriços, macacos e possivelmente algumas raças de camundongos, ratos e coelhos domésticos. Para muitas outras espécies, a suscetibilidade é desconhecida. Até o momento, répteis, anfíbios ou aves não demonstraram ser suscetíveis à infecção por MPXV ou qualquer outro orthopoxvirus.

No surto atual, casos de transmissão de MPXV de humano para animal de estimação por contato próximo foram relatados esporadicamente. Animais de estimação ou outros animais que estiveram em contato com um caso humano provável ou confirmado de mpox e que **desenvolvem sintomas de dentro de 21 dias** após o contato devem ser testados para mpox. Os sintomas nos animais infectados não são totalmente descritos, mas podem incluir erupção cutânea ou outras lesões cutâneas, conjuntivite, letargia, perda de apetite, tosse, falta de ar, secreção nasal ou crostas e/ou febre.

Os procedimentos descritos acima devem ser seguidos para a coleta, manuseio e envio de amostras de animais. Em animais com erupções cutâneas, amostras de pele (em particular, swabs da superfície e/ou fluidos da lesão e crostas) devem ser priorizadas. Em animais sem envolvimento da pele, swabs orofaríngeos,

nasais ou anais podem ser úteis. No entanto, os dados sobre a sensibilidade de detecção do vírus para diagnóstico nesses tipos de amostra são limitados, portanto, os resultados negativos devem ser interpretados com cautela.

Como em humanos, os testes para infecção por MPXV em animais são baseados na detecção de DNA viral por PCR. Por conseguinte, os ensaios acima descritos podem ser utilizados para analisar amostras de animais. Dependendo dos regulamentos locais e nacionais, os testes em amostras de animais podem ser realizados no mesmo laboratório que as amostras humanas ou em laboratórios diferentes. Em contextos em que os testes não estão disponíveis em laboratórios de saúde animal e onde os laboratórios de saúde pública não podem receber amostras de animais, os países podem considerar a extração de DNA em um laboratório de saúde animal e a PCR em um laboratório de saúde pública.

Referências

Organização Mundial da Saúde. Multi-country outbreak of mpox, External situation report#35- 12 August 2024. Geneva: WHO; 2024. Disponível em inglês: <https://www.who.int/publications/m/item/multi-country-outbreak-of-mpox--external-situation-report-35--12-august-2024>

Organização Pan-Americana da Saúde / Organização Mundial da Saúde. Alerta Epidemiológica Viruela símica (MPXV clado I), 8 de agosto del 2024. Washington, D.C.: OPS/OMS; 2024. Disponível em: <https://www.paho.org/es/documentos/alerta-epidemiologica-viruela-simica-mpxv-clado-i-8-agosto-2024>

Organização Mundial da Saúde. Pruebas de diagnóstico para el virus de la viruela símica: orientaciones provisionales, 10 de mayo de 2024. Disponível em: <https://www.who.int/es/publications/i/item/WHO-MPX-Laboratory-2024.1>

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

Organização Mundial da Saúde. Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2021-2022. Ginebra: OMS; 2021. Disponível em inglês: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240019720>

Viruela símica: los expertos cambian el nombre de las variantes del virus. 12 de agosto de 2022. Ginebra: OMS; 2021. Disponível em: <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. Disponível em inglês: [doi: 10.1016/j.jviromet.2010.07.012](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.07.012)

Organização Pan-Americana da Saúde. Manual de mantenimiento para equipo de laboratorio. Disponível em: <https://www.paho.org/es/documentos/manual-mantenimiento-para-guias-laboratorio>

Organização Mundial da Saúde. Reglamento Sanitario Internacional (2005) Tercera edición. Ginebra: OMS; 2016. Disponível em: <https://www.who.int/es/publications/i/item/9789241580496>

Anexo 1

MPXV - Protocolo de PCR em tempo real

Ensaio para detecção genérica de MPXV (espécie: *Orthopoxvirus monkeypox*, género: *Orthopoxvirus*) e de seus dois clados:¹

- Ensaio com iniciadores e sonda G2R_G: detecta todas as cepas de MPXV
- Ensaio com iniciadores e sonda C3L: detecta as cepas do clado Ia, mas não as cepas do clado Ib
- Ensaio com iniciadores e sonda G2R_WA: detecta as cepas do clado II (detecta clados IIa e IIb)
- As sequencias dos iniciadores e sondas estão no final do documento.
- Todas as sondas são do tipo sonda de hidrólise (“TaqMan”) unida a fluoróforo FAM e *quencher* BHQ-1.

1. Mistura de reação

As misturas para cada um dos ensaios (G2R_G, G2R_WA ou C3L) são preparados separadamente.

Componente	Volume por reação	
	EXPRESS qPCR Supermix Universal ²	TaqMan® Universal PCR Master Mix ³
água (livre de RNAase/DNAase) ⁴	3.0 µl	3.0 µl
tampão de reação (2x) ⁴	10.0 µl	10.0 µl
iniciador direto (10 µM)	0.8 µl	0.8 µl
iniciador reverso (10 µM)	0.8 µl	0.8 µl
sonda (10 µM)	0.4 µl	0.4 µl
Total por reação	15 µl	

2. DNA

Adicionar **5 µl** de DNA ou controle aos 15 µl de mistura de reação (volume total de reação: 20 µl).

Inclua controles positivos e negativos para avaliar a validade da 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 Os volumes são para uso pelos kits listados devem ser ajustados ao usar outros kits.

Isenção de responsabilidade: A menção de empresas ou produtos específicos de determinados fabricantes não implica que a Organização Pan-Americana da Saúde os aprove ou recomende em detrimento de outros de natureza semelhante que não sejam mencionados.

3. Ciclagem⁵

Ensaio G2R_G ou ensaio C3L	
EXPRESS qPCR Supermix Universal	TaqMan® Universal PCR Master Mix
2 passos de:	2 passos de:
50°C por 2 minutos (incubação UNG)	50°C por 2 minutos (incubação UNG)
95°C por 6 minutos (ativação da polimerase)	95°C por 10 minutos (ativação da polimerase)
45 ciclos de PCR:	45 ciclos de PCR de:
95°C por 15 segundos	95°C por 15 segundos
60°C por 30 segundos (Leitura de fluorescência nesta etapa)	60°C por 30 segundos (Leitura de fluorescência nesta etapa)

Ensaio G2_WA	
EXPRESS qPCR Supermix Universal	TaqMan® Universal PCR Master Mix
2 passos de:	2 passos de:
50°C por 2 minutos (incubação UNG)	50°C por 2 minutos (incubação UNG)
95°C por 6 minutos (ativação da polimerase)	95°C por 10 minutos (ativação da polimerase)
45 ciclos de PCR:	45 ciclos de PCR de:
95°C por 15 segundos	95°C por 15 segundos
62°C por 30 segundos (Leitura de fluorescência nesta etapa)	62°C por 30 segundos (Leitura de fluorescência nesta etapa)

⁵ Os tempos de incubação e ativação da polimerase da UNG são para uso nos kits indicados e devem ser ajustados ao usar outros kits.

4. Sequências de iniciadores e sondas

Ensaio G2R_G (detecção genérica de MPXV)	
iniciador G2R_G direto	5'-GGAAAATGTAAAGACAACGAATACAG
iniciador G2R_G reverso	5'-GCTATCACATAATCTGGAAGCGTA
sonda G2R_G	5'FAM-AAGCCGTAATCTATGTTGTCTATCGTGTCC-3'BHQ1

Ensaio G2_WA (detecção das cepas do clado II)	
iniciador G2R_WA direto	5'-CACACCGTCTCTCCACAGA
iniciador G2R_WA reverso	5'-GATACAGGTTAATTTCCACATCG
sonda G2R_WA	5'FAM-AACCCGTCGTAACCAGCAATACATTT-3'BHQ1

Ensaio C3L (detecção das cepas do clado Ia)	
iniciador C3L direto	5'-TGTCTACCTGGATACAGAAAGCAA
iniciador C3L reverso	5'-GGCATCTCCGTTTAATACATTGAT
sonda C3L	5'FAM-CCCATATATGCTAAATGTACCGGTACCGGA-3'BHQ1

Anexo 2

Potenciais opções comerciais para PCR de MPXV

Companhia	Kit	Referência	Alvo	Componentes e controles do kit	Transporte	Reagentes adicionais requeridos	Revisão	Expiração
Shanghai ZJ Bio-Tech Co	Liferiver Monkeypox Virus Real Time PCR Kit	ZD-0076-02 25 testes/estuche	Genes MPXV F2L/F3L Controle interno	Extração de ADN Master mix Enzima Controle positivo	Gelo seco	Nenhum	Revisão da documentação pela OMS Validação em andamento	12 meses
Tib Molbiol	LightMix® Modular Monkeypox	53-0550-96 96 testes /estuche (Também distribuído por Roche)	Genes MPXV J2L/J2R Controle interno	Iniciadores e sondas liofilizados Controle positivo liofilizado	4-25 °C	Kit de extração Enzima: 1-step RT qPCR (Referência: 90-9999-96, 96 testes/estuche, envio a 4-25 °C) ou outra enzima	Revisão da documentação pela OMS Validação em andamento	12 meses
Jiangsu Bioperfectus Technologies	Monkeypox Virus Real Time PCR Kit	YJC70115NW- 50T 50 testes /estuche	Gene MPXV F3L Controle interno	Mix da reação Mix de detecção (iniciadores/sonda) Controle positivo	Gelo seco	Kit de extração	Validação pelo NCDC (Nigeria)	12 meses
KH Medical	RADI Monkeypox Detection Ki	RV015 100 testes/estuche	Clado I Clado II Controle interno	Master mix Enzima Controle positivo	Gelo seco	Kit de extração	Validação pelo INRB (República Democrática do Congo) vs protocolo in house do CDC protocolo com amostras do clado I	12 meses
Genes2Life	PoxVirDetect	G2LPVSP-01 120 testes /estuche (limitações de exportação)	MPXV (genérica ou específica do clado) Controle interno	Mix de reação Controle positivo	Gelo seco	Kit de extração	Verificação pelo InDRE (México)	12 meses

Isonção de responsabilidade: A menção de empresas ou produtos específicos de certos fabricantes não implica que a Organização Pan-Americana da Saúde os aprove ou recomende em detrimento de outros de natureza semelhante que não sejam mencionados.