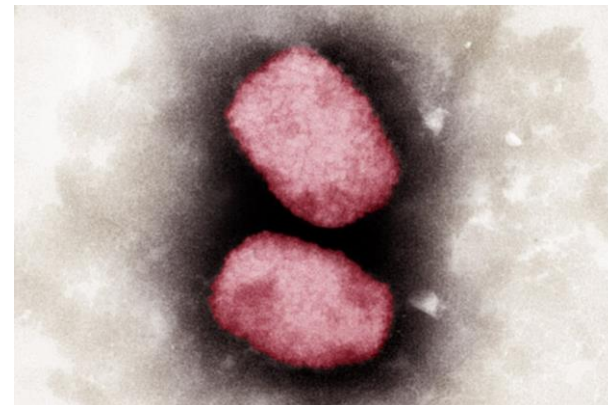


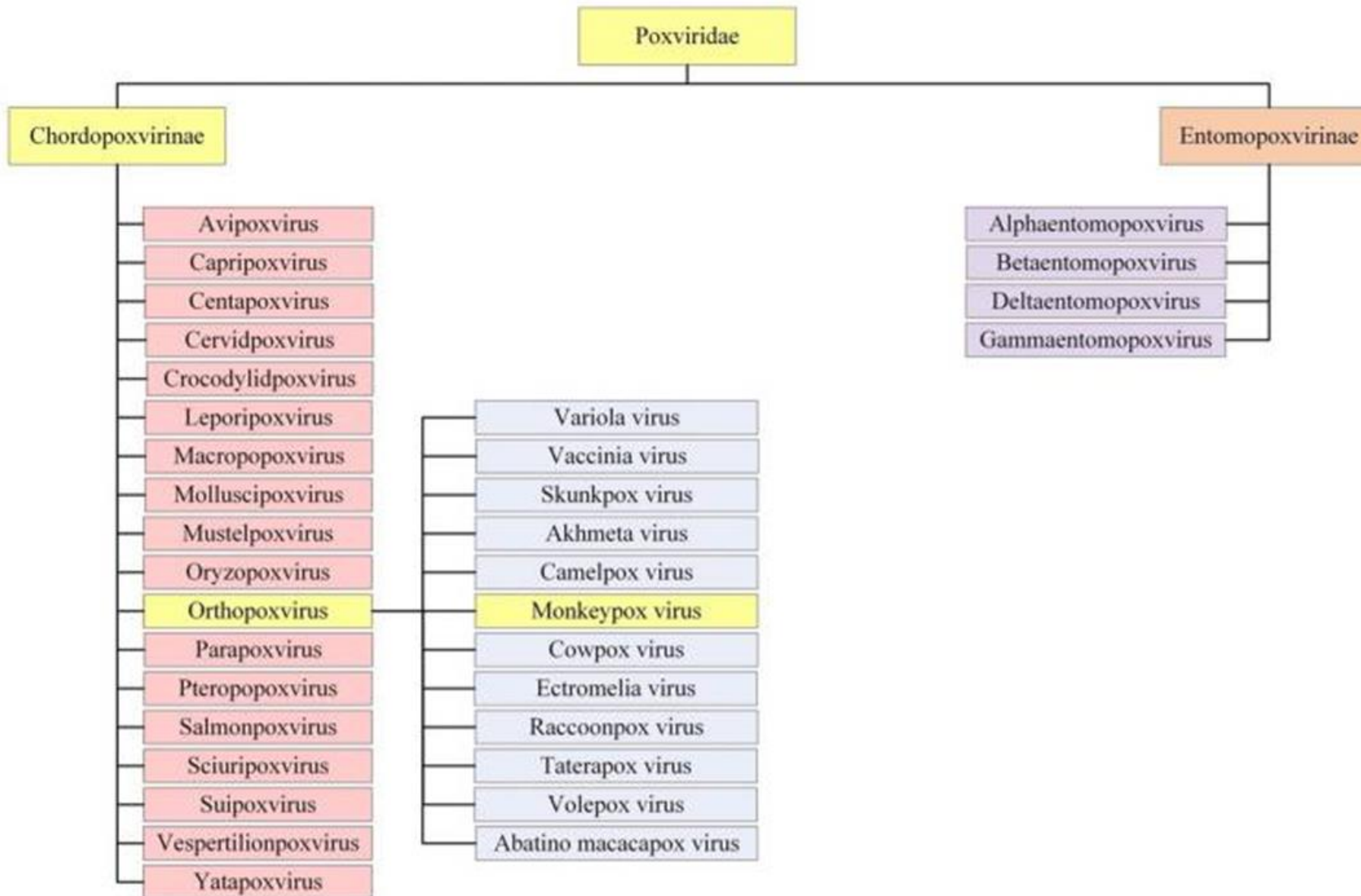
Monkeypox virus a laboratorní diagnostika

Helena Jiřncová



Systematické zařazení Poxvirus

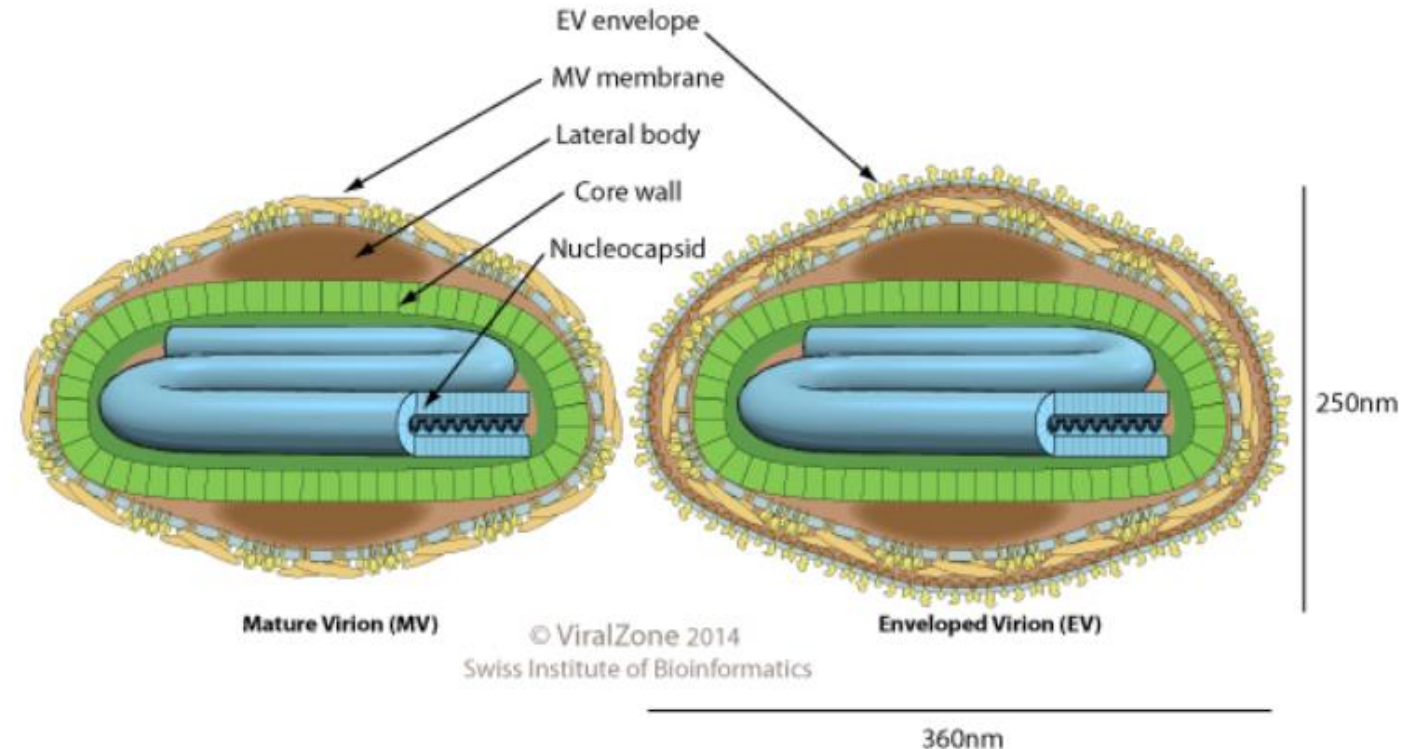
Chordopoxvirinae (18 rodů, 52 druhů) and *Entomopoxvirinae* (4 rody, 30 druhů).



Orthopoxviry Enveloped, brick-shaped virion

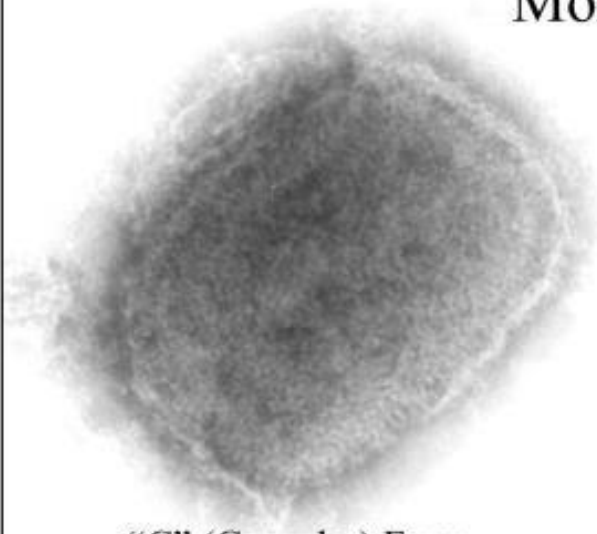
- **250nm x 200nm**
- Povrchová membrána-**tubuly/povrchové filamenty**
- 2 formy infekčních partikulí:
 - **intracellular mature virus (IMV)** and
 - **extracellular enveloped virus (EEV)**
- Lineární, **dsDNA: 170-250kb.**
- **inverted terminal repeat (ITR)** sequences – vlásenka na koncích

VIRION

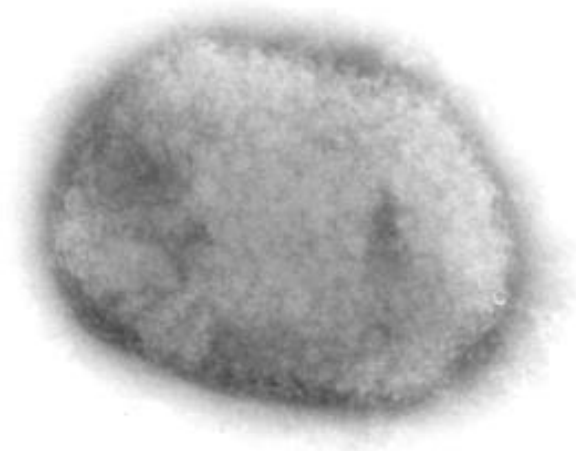


POXVIRUSES - genetická informace pro celý replikační aparát (REPLICACI, TRANSCRIPCI, ASSEMBLY), + NS proteiny, MPXV - 232 ORF

Monkeypox Virus



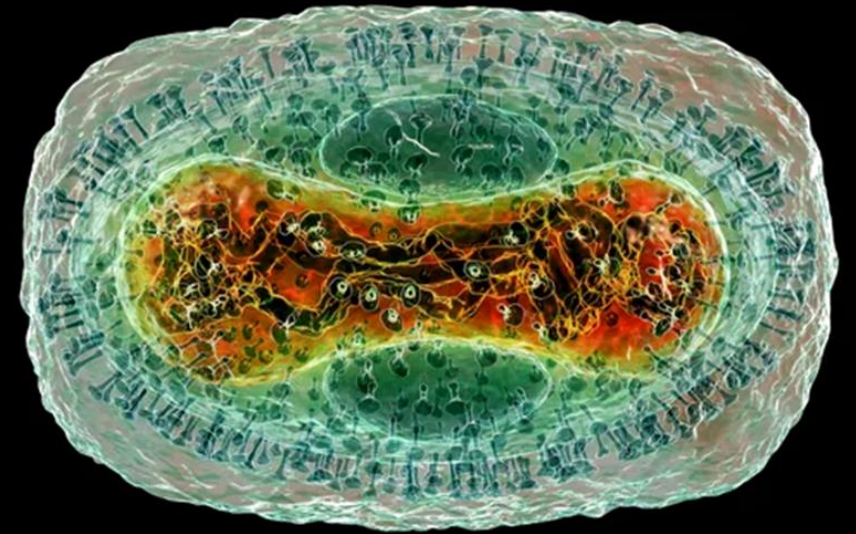
“C” (Capsular) Form



“M” (Mulberry) Form

Depending on penetration of the stain, the surface of “M”, (or “mulberry”) virions are covered with short, whorled filaments, while “C”, (or “capsular”) form virions penetrated by stain present as a sharply defined, dense core surrounded by several laminated zones of differing densities.

Monkeypox virus particle. Credit:
Kateryna Kon/Science Photo Library/ Getty Images



MPXV

Referenční kmen: Monkeypox virus UK/MPXV-UK_P2/2020

Genom: centrální konzervovaná oblast: "housekeeping" geny (transkripce, replikace, assembly)

Geny v terminálních oblastech se liší dle příslušnosti k rodu, druhu a ovlivňují virulenci, patogenitu, hostitelské spektrum.

Pojmenování genů: HindIII RE digesce vaccinia viru – podle velikosti od A až P, dále jsou číslovány a podle směru transkripce značeny R doprava, nebo L, doleva

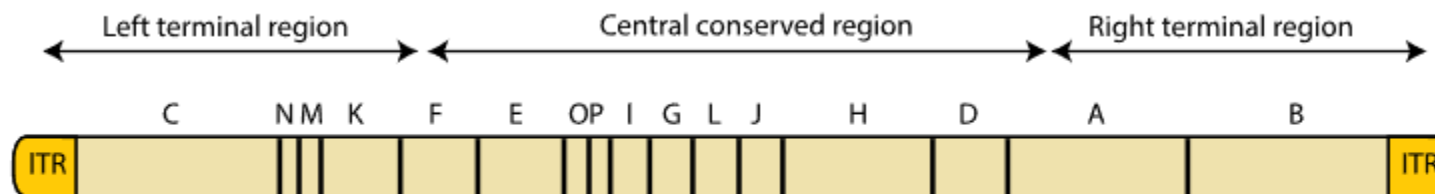
E9L -fragment E , 9. pozice, transkripce doleva.

Mutační rychlost- 10^{-5} až 10^{-6} na nukleotid (o 1 až 3 řády pomaleji než virus spalniček).

[Fundamentals of Molecular Virology, 2nd Edition](#); N. H.

Acheson, Wiley ISBN: 978-0-470-90059-8

Monkeypox reference strain: Nextstrain, Richard Neher.



ITR= Inverted terminal repeats

Rezervoár:



Krysa obrovská africké veverky rodu *Funisciurus*,
nebo plši rodu *Graphiurus* (perzistující infekce),



Pro virus citlivých zvířat je pravděpodobně
mnohem více:

Primáti: mangabej - *Cercocebus atys*
psoun prériový - *Cynomys ludovicianus*,

vačici opossum (*Didelphis marsupialis*), činčila
(*Chinchilla lanigera*), kopytníci, rejsci, ježci
(*Atelerix* spp.)

Orthopox – životní cyklus

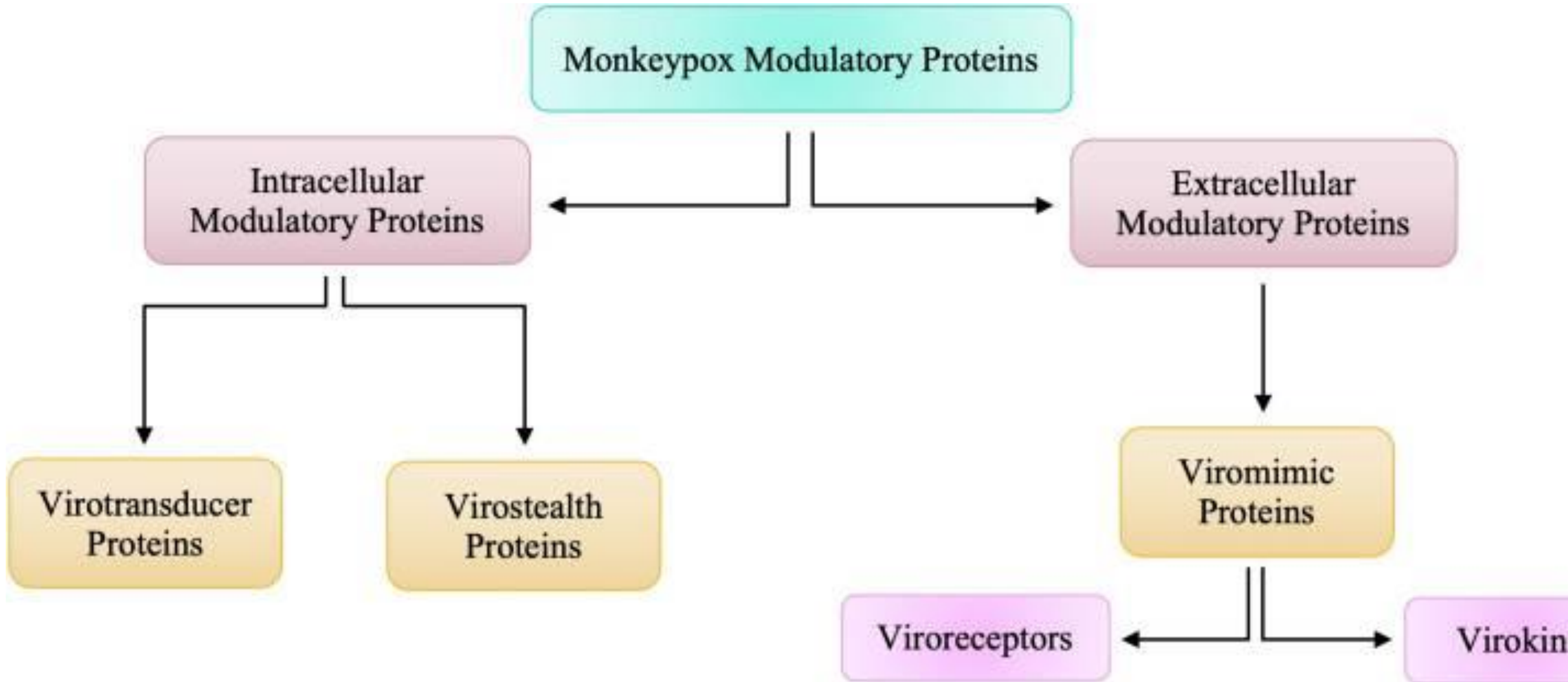
- **časná fáze:** cytoplazma, v-RNA polymerase. Zahájení 30 min po infekci
 - Repilkační aparát, host-modulační factory, enzymy a extracellulární membránové proteiny (cca 118 genů; vaccinia virus)
 - Odhalení virového „jádra“.
- **Intermediální fáze:** replikace genomové DNA, 100 min po infekci.
- **Pozdní fáze:** strukturální proteiny, od 140 min do 48 hod po infekci,.
- **Assembly** - [cytoplasmic viral factories](#), **sférické nezralé částice.**
brick-shaped intracellular mature virion (IMV).
- **IMV viriony jsou vylučovány po buněčné lýze**
- **EEV viriony** po průchodu Golgiho aparátem získají druhou dvojitou membránu a klasicky vypučí

Orthopox viry

- **Cytoplazmatická lokalizace –nepotřebují inkorporaci do buněčného jádra – kompartmenty: viral factories (VFs).**
- Viral factories – (intracellular compartments), zvyšují účinnost replikace a fungují jako štít
- **Přichycení na buňku - glycosaminoglycany (GAGs) ⇒**
 - **endocytosu** nebo
 - **apoptotic mimicry - phosphatidyl serin receptor (PS) – buňky immun. system rozpoznají jako signál umírajících buněk)**
- Flaviviry (West Nile Virus, Dengue, Yellow Fever), filoviry (Ebola, Maburg), New World arenaviry (Junin, and Machupo), baculovirus, and alphaviry (Chikungunya)
- **X** Old World arenaviry (Lassa – haemorrhagic fever), koronaviry, influenza A virus, herpes simplex virus 1

Fosfatidylserin APOPTOTIC MIMICRY

- Fosfatidylserin (zkratka **Ptd-L-Ser** nebo **PS**) je fosfolipid (konkrétně glycerolfosfolipid), který je složkou buněčných membrán
- nese záporný náboj (na rozdíl od jiných běžnějších fosfolipidů).
- vyskytuje se téměř výhradně ve **vnitřním listu membrány**,
- Díky fosfatidylserinu může např. řada signálních proteinů rozeznávat vnitřní stranu membrány (např. proteinkináza C).
- Když se fosfatidylserin objeví na vnějším listu membrány, značí to probíhající programovanou buněčnou smrt (apoptózu) a signalizuje to např. makrofágům, aby danou buňku pozřeli.



Modulační mechanismy

VIROSTEALTH maskování virové infekce

Snížení exprese MHC I receptorů u cirkulujících T lymfocytů CD8⁺ CTLs - různé způsoby

Snížení exprese CD4, receptorů (MHC II-restricted antigen-induced T-cell activation)

VIROTRANSDUCERS intracelulární proteiny inhibující dráhy podílející se na vrozené antivirové obraně (apoptóza, prozánětlivá kaskáda, ovlivnění hostitelského spektra

VIROMIMICRY: extracelulární dráhy ovlivňující časnou zánětlivou odpověď (KOMPLEMENT, IFNS, prozánětlivé cytokiny, chemokiny, růstové faktory).

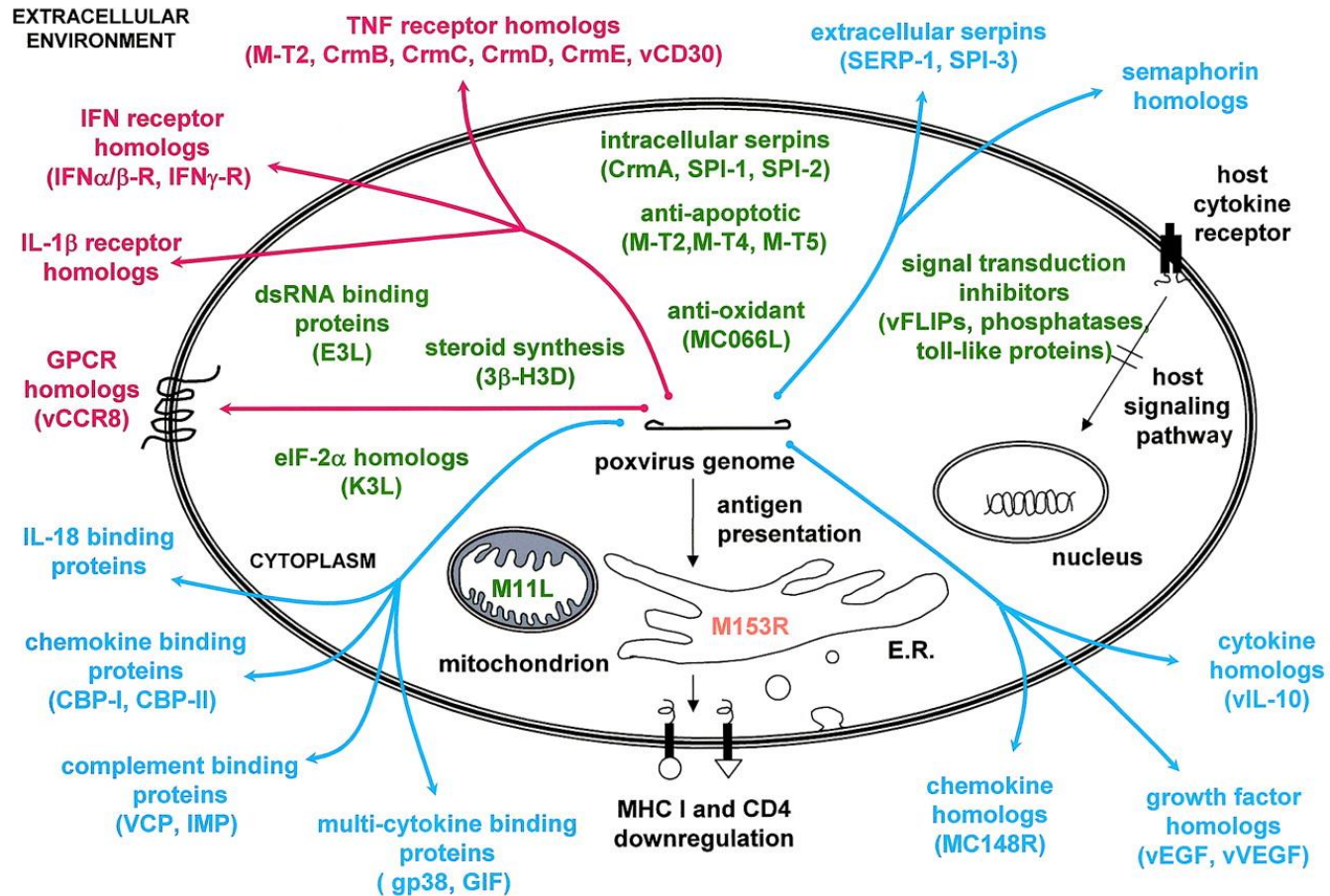
VIROKINY sekretorické proteiny napodobující hostitelské regulační proteiny, cytokiny (TNF) , složky komplementy,.

TNF klíčová role ve virové infekci, aktivace makrofágů, NK buněk. T lymfocytů a APC the recruitment and activation of macrophages, natural killer cells, T cells, and antigen-presenting cells—the depletion of TNF by treatment with TNF blockers might facilitate the development or reactivation of viral infection.

• **Viroreceptors.**

- All poxviruses are thought to employ extracellular and/or intracellular mechanisms to disrupt IFN activity, mimics of both IFN- α/β and IFN- γ receptors (IFN-Rs) represent the most common poxvirus extracellular strategies to evade the antiviral effects of these cytokines

Orthopoxviry – modulační NSP



Virostealth (orange), virotransduction (green), and viromimicry (viroreceptors [red] and virokines [blue]) are indicated. GPCR, G-protein-coupled receptor; GIF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/IL-2 factor; IMP, inflammation modulatory protein; vEGF, viral epidermal growth factor; vVEGF, viral vascular endothelial growth factor.

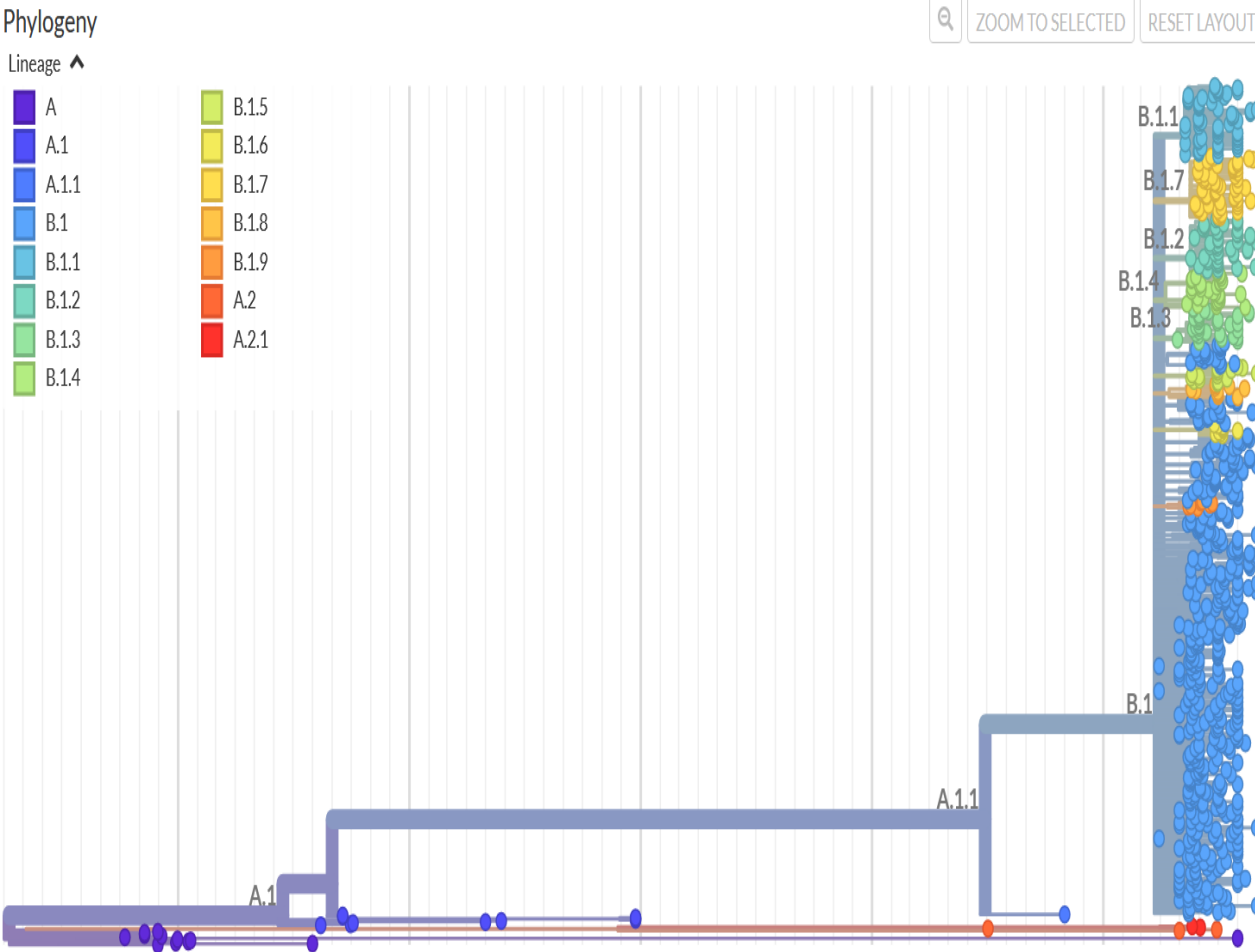
Orthopoxviry – imunomodulační NSP

- **BR-203: virulence , ovlivnění apoptózylymfocytů**
- **BR-209: interleukin-1 β binding protein**
- Blokuje vazbu na IL-1 receptor - ovlivňuje zánětlivou odpověď
- **COP-C3L: complement control protein**
- Inhibuje časnou fázi aktivace komplementu (variola virus - smallpox inhibitor of complement enzymes -SPICE)
- **COP-A44L: hydroxysteroid dehydrogenase**
- Ovlivňuje virulenci zvýšením produkce steroidů – potlačení imunitní odpovědi)
- **COP-B7R: virulence, ER-resident protein - ???**
- **COP-C10L: IL-1 β antagonist**
- Připomíná IL-1 receptor antagonistu - , ovlivňuje zánětlivou odpověď
- **COP-E3L: IFN-resistance protein**
- Krátký E3L protein (C-terminal doména) vazba na ds RNA funkce není jasná.

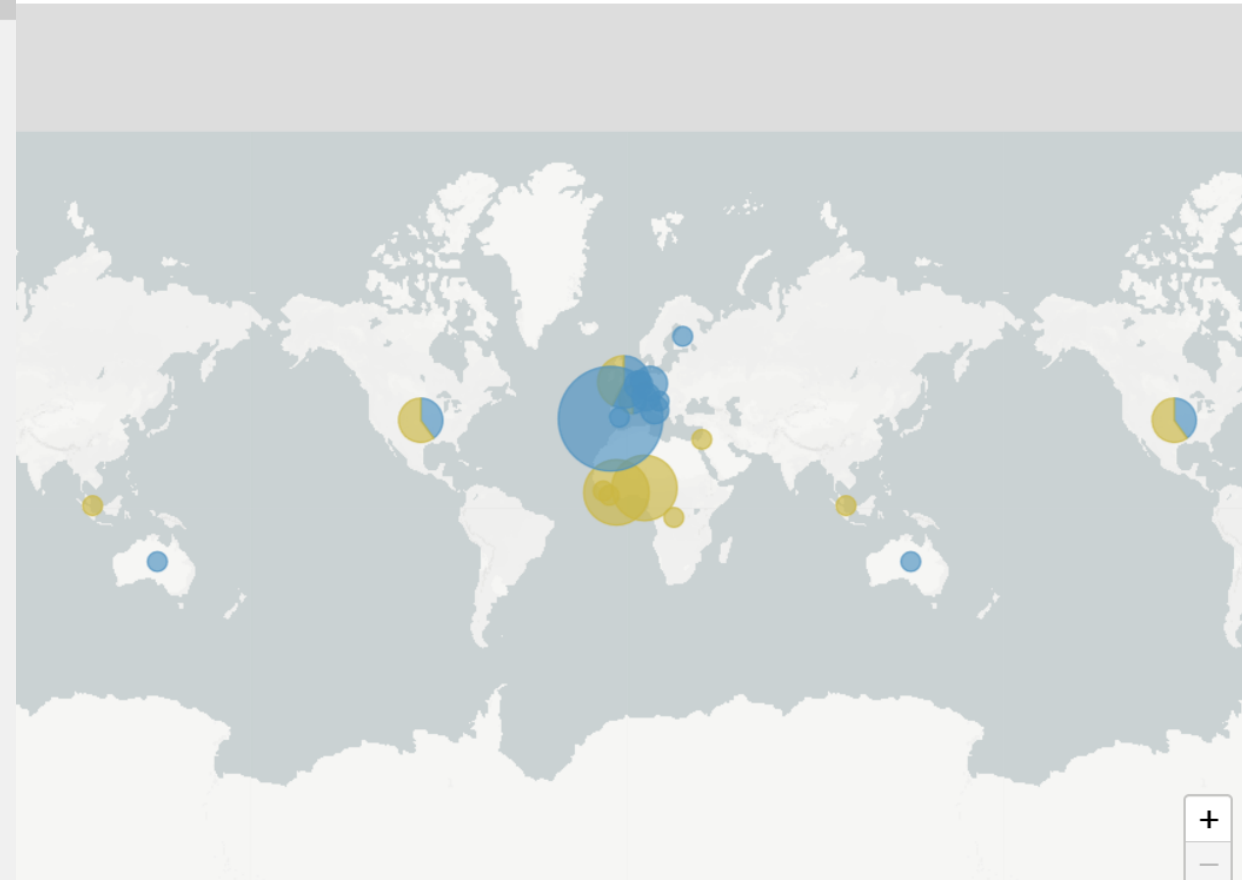
Genomic epidemiology of monkeypox virus

Built with [nextstrain/monkeypox](#). Maintained by [Nextstrain team](#). Enabled by data from [GenBank](#).

Showing 793 of 793 genomes sampled between Oct 2017 and Aug 2022.



Geography

RESET ZOOM



Range

10-05 2022-09-20

LAY RESET

Order By

Clade / Lineage

Data

Filter query here...

Options

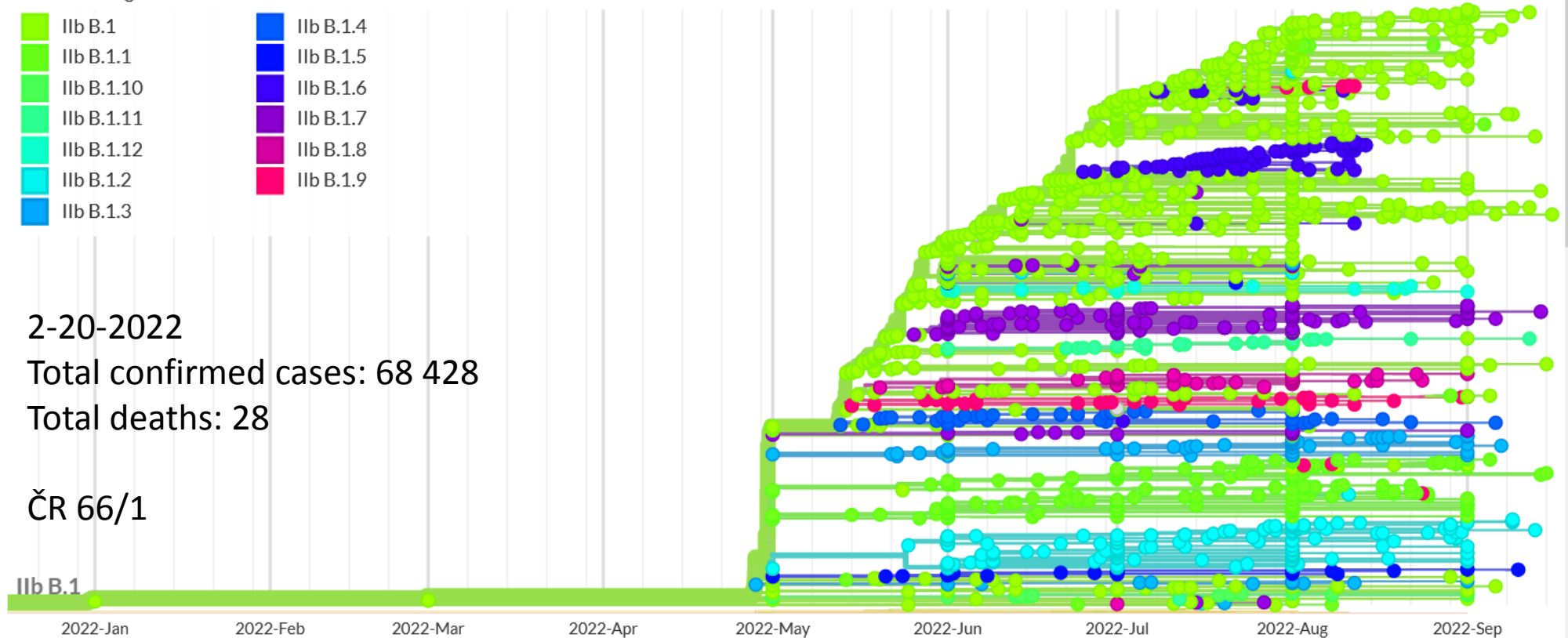
Showing 2 153 of 2 185 genomes collected between Jan 2022 and Sep 2022, last updated 2022-10-01

Phylogeny

Clade / Lineage

- | | |
|------------|-----------|
| Ilb B.1 | Ilb B.1.4 |
| Ilb B.1.1 | Ilb B.1.5 |
| Ilb B.1.10 | Ilb B.1.6 |
| Ilb B.1.11 | Ilb B.1.7 |
| Ilb B.1.12 | Ilb B.1.8 |
| Ilb B.1.2 | Ilb B.1.9 |
| Ilb B.1.3 | |

ZOOM TO SELECTED



2-20-2022

Total confirmed cases: 68 428

Total deaths: 28

ČR 66/1

Ilb B.1

2022-Jan

2022-Feb

2022-Mar

2022-Apr

2022-May

2022-Jun

2022-Jul

2022-Aug

2022-Sep

APOBEC3 - apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide-like 3

- cytidin deamináza innátní obrana (retroviry, HIV, herpetické viry)
- mutační bias (from GA to AA or TC to TT) stop kodón, TRP
- PHEIC (Public Health Emergency of International Concern)

Skrytá evoluce MPXV od 2018

- Výrazně vyšší podíl A aT než bychom očekávali
- APOBEC3: C to Ts. APOBEC3
- možnost editace genomu mnoha virů včetně SARS-CoV-2,
- Počet mutací naznačuje skryté šíření , od roku 2018?
- Skyté šíření před epidemií 2022
- MPXV strain in 2018,
- 46 nových mutací
 - MPXV – celkem 187 proteinů - 10 z nich vyšší podíl mutací
 - (D2L-like, OPG023, OPG047, OPG071, OPG105, OPG109, A27L-like, OPG153, OPG188, OPG210).

Laboratorní diagnostika

- Klinický materiál

1. NSP
2. stěr z erozí, lézí, puchýřků krust
3. Vezikulární tekutina
4. Krev není vhodným klinickým materiálem

Možnosti:

1. Suchý stěr
2. Stěr do virologického transportního média

Laboratorní diagnostika - PCR

- Orthopox – pozitivní nálezy musí být potvrzeny
- Monkeypox – ideálně doplnit o průkaz Clade II, v případě MPXV pozitivita a Clade II negativita – průkaz Clade I
- Monkeypox + VZV
- K dispozici CE IVD soupravy

Epidemiologické šetření

- Průkaz anti MPXV IgG

In house PCR

Yu Li, Hui Zhao, Kimberly Wilkins, Christine Hughes, Inger K. Damon,
Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African
and Congo Basin strain DNA,
Journal of Virological Methods, Volume 169, Issue 1, 2010, Pages 223-227, ISSN
0166-0934, <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.07.012>.

MPXV Congo Basin a West African 99% sequence identity

Generická PCR MPXV a WA PCR: TNF receptor gen - G2R, (terminal
inverted repeat region - ITR)

Congo basin PCR: complement binding protein (C3L) gene, kompletní
delece u WA kmene

Gene target	Targeted lineage	Oligonucleotide	Sequence ^b	T _m in °C ^c	R
ATI	West African	F	GAGATTAGCAGACTCCAA	57.9	
		R	TCTCTTTCCATATCAGC	56.2	
		P1	GCAGTCGTTCAACTGTATTTCAAGATCTGAGAT-Fluorescein	68.9	
F3L	Monkeypox generic	F	CTCATTGATTTTTCGCGGGATA	63.6	
		R	GACGATACTCCTCCTCGTTGGT	67.0	
		P	6FAM-CATCAGAATCTGTAGGCCGT-MGBNFQ	60.5	
N3R	Monkeypox generic	F	AACAACCGTCCTACAATTAACAACA	66.0	
		R	CGCTATCGAACCATTTTGTAGTCT	65.4	
		P	FAM-TATAACGGCGAAGAATATACT-MGBNFQ	55.9	
E9L-NVAR	Eurasian orthopox (non-variola)	F	TCAACTGAAAAGGCCATCTATGA	64.2	
		R	GAGTATAGAGCACTATTTCTAAATCCCA	64.1	
		P	TET-CCATGCAATATACGTACAAGATAGTAGCCAAC-QSY7	67.5	
B6R	Monkeypox generic	F	ATTGGTCATTATTTTGTACAGGAACA	66.3	
		R	AATGGCGTTGACAATTATGGGTG	65.9	
		P	MGB/DarkQuencher-AGAGATTAGAAATA-FAM	39.2	
ATI	Congo	F	GAGATTAGCAGACTCCAA	57.9	
		R	GATTCAATTTCCAGTTTGTAC	57.9	
		P1	GCAGTCGTTCAACTGTATTTCAAGATCTGAGAT-Fluorescein	68.9	
		P2	LCRed640-CTAGATTGTAATCTCTGTAGCATTCCACGGC-Phos	68.6	
G2R_WA	Monkeypox West African-specific	F	CACACCGTCTTCCACAGA	65.4	
		R	GATACAGGTTAATTTCCACATCG	61.4	
		P	FAM-AACCCGTCGTAACCAGCAATACATTT-BHQ1	67.8	
G2R_G	Monkeypox generic	F	GGAAAATGTAAAGACAACGAATACAG	62.9	
		R	GCTATCACATAATCTGGAAGCGTA	64.2	
		P	FAM-AAGCCGTAATCTATGTTGTCTATCGTGTCC-BHQ1	68.2	
C3L	Monkeypox Congo basin-specific	F	TGTCTACCTGGATACAGAAAGCAA	65.4	
		R	GGCATCTCCGTTTAATACATTGAT	63.4	
		P	FAM-CCCATATATGCTAAATGTACCGGTACCGGA-BHQ1	69.1	
B7R	Monkeypox generic	F	ACGTGTTAAACAATGGGTGATG	63.3	
		R	AACATTTCCATGAATCGTAGTCC	62.7	
		P	TAMRA-TGAATGAATGCGATACTGTATGTGTGGG-BHQ2	67.8	
F3L	Monkeypox generic	F	CATCTATTATAGCATCAGCATCAGA	62.1	
		R	GATACTCCTCCTCGTTGGTCTAC	64.3	
		P	JOE-TGTAGGCCGTGTATCAGCATCCATT-BHQ1	68.8	

[Huggett Jim F](#), [French David](#), [O'Sullivan Denise M](#), [Moran-Gilad Jacob](#), [Zumla Alimuddin](#). Monkeypox: another test for PCR. [Euro Surveill.](#) 2022;27(32):pii=2200497. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.32.2200497>

TNF receptor homolog

- homolog TNF receptoru (TNFR),
- Výhoda pro hostitele i virus, snížení hladin TNF – proti zánětlivý účinek.
- Infekce myši mutantním virem ectromelia postrádajícím virový TNFR (vTNFR) způsobila významnou plicní patologii a smrt v důsledku sekrece nadměrných hladin TNF a dalších zánětlivých cytokinů.
- vTNFR prospívá hostiteli tím, že umožňuje přežití, potenciálně usnadňuje šíření viru, což by mělo být pro virus výhodné.

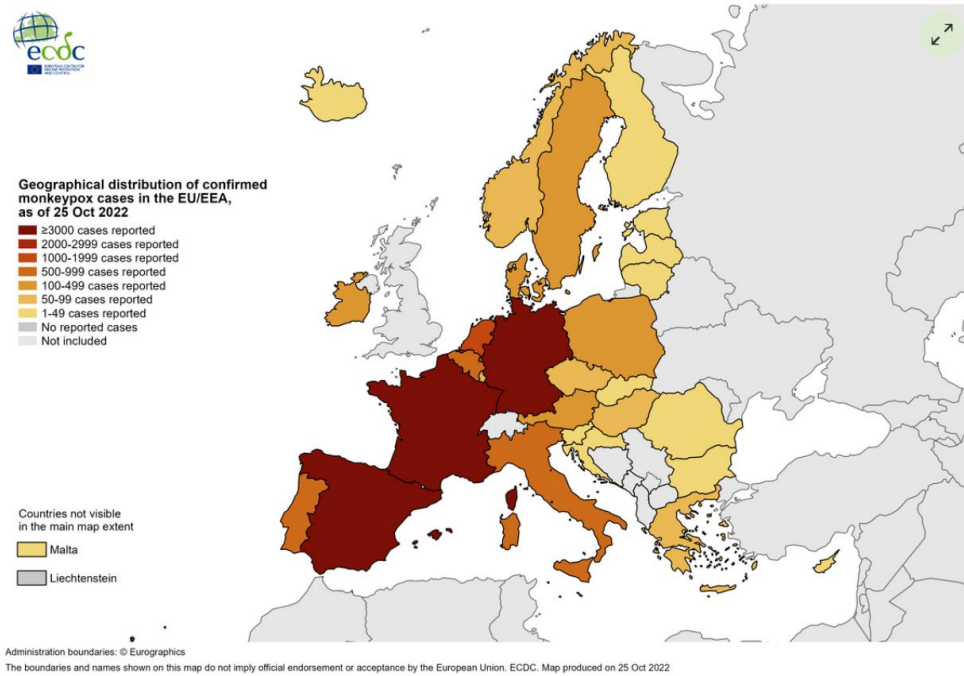
ELISA/imunofluorescence

- In house, křížově reagující protilátky
- Buněčné kultury – VRAT, BSL3, SUJB
- VERO MA104 (inhibice syntézy interferonu)
- ale i VERO E6, HeLa a mnoho dalších

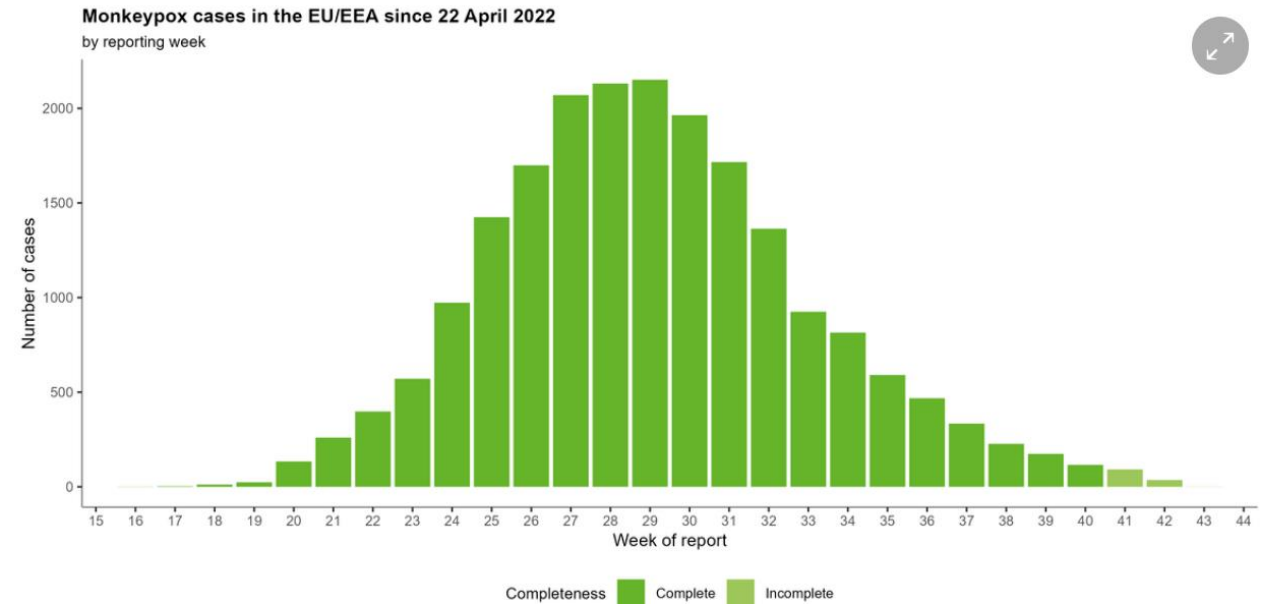
Evoluce Orthopoxvirů, VARV a MPXV

- Na základě současných sekvenačních VARV DNA a DNA nových druhů orthopoxvirů – **změny v molekulární evoluci**
- Orthopoxviry Starého a Nového světa se oddělily přibližně před 40 000 lety;
- Moderní druhy orthopoxvirů vznikly před 1700 až 6000 lety, s výjimkou VARV, který se objevil přibližně v roce 300 našeho letopočtu.
- K oddělení genetických variant některých druhů došlo později -
 - MPXV clade II (WA) vznikl přibližně před 600 lety a
 - subtyp VARV minor alastrim se objevil přibližně před 300 lety.

Geographical distribution of confirmed monkeypox cases in the EU/EEA since the start of the outbreak, and as of 25 October 2022



Number of confirmed monkeypox cases reported weekly in the EU/EEA, as of 25 October 2022



Celosvětově k 5/11/2022 více než 78 000 případů/45 úmrtí

Co nás čeká ? MPXV

- Endemický virus mimo dosavadní typický region?
- Rozšíření hostitelského spektra?
- Rozšíření klády I (Congo basin clade) mimo Kongo? – příklad Súdán
- Evoluce doprovázená ztrátou genů či jejich úseků a rekombinacemi u klád IIa a IIb (West African)
- Tedy evoluce k vyšší klinické závažnosti?



- Povinné očkování?
- Skryté šíření od roku 2018?
- Delece genu pro TNFR?

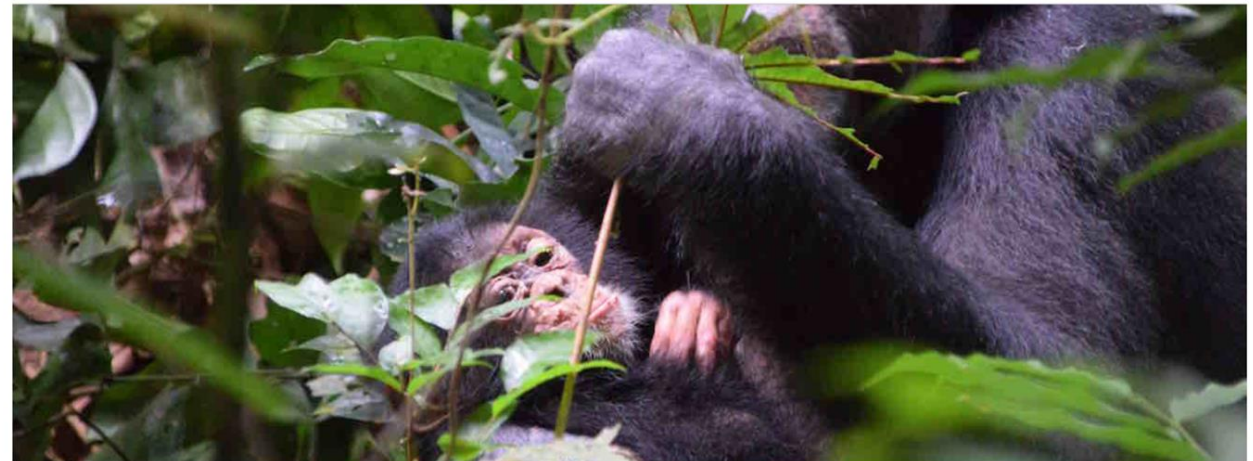
Nelze zapomínat na:

- Šíření viru v zoonotickém rezervoáru v Africe
- Zoonotické atypické symptomatologie
 - (asymptomatické či pouze respirační projevy u šimpanzů)
- Neuroafinitu viru

Mongabay Series: [Great Apes](#)

Mystery ailments, asymptomatic individuals: Spotlight on monkeypox in chimps

by [Shreya Dasgupta](#) on 5 June 2020



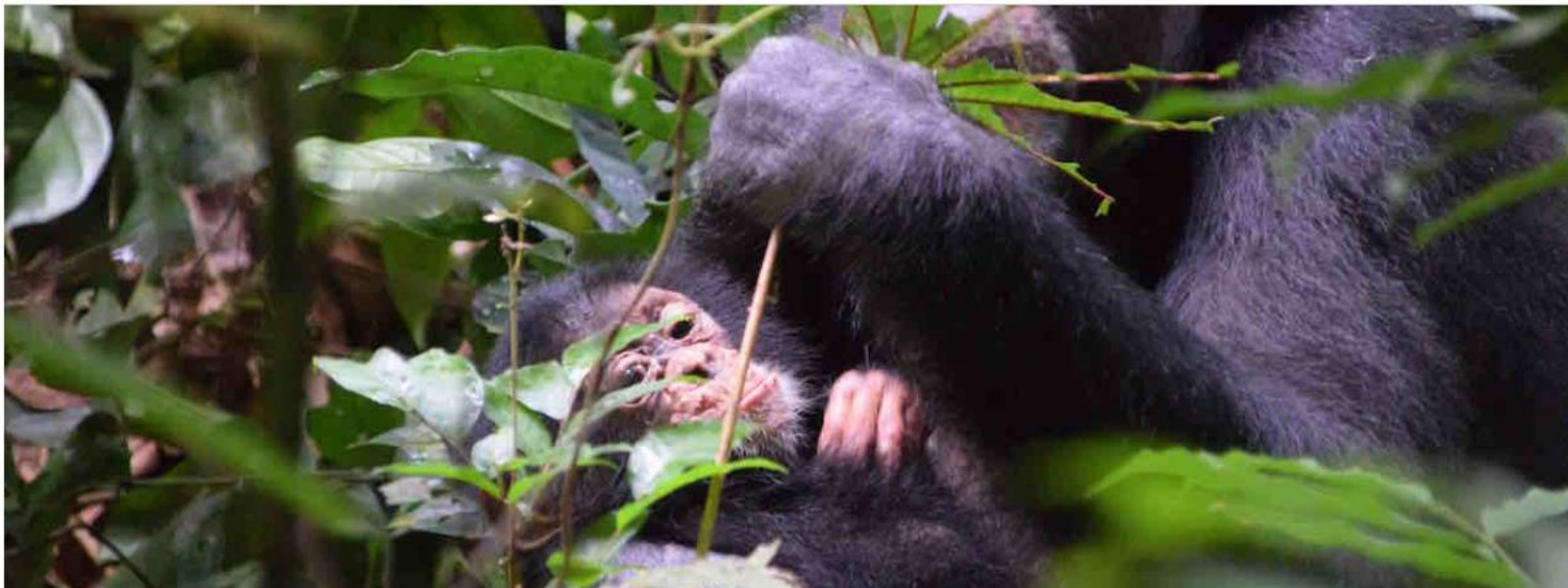
© 2020 Mongabay.com. All rights reserved. | [Mongabay.com](#)

Děkuji za pozornost

Mongabay Series: [Great Apes](#)

Mystery ailments, asymptomatic individuals: Spotlight on monkeypox in chimps

by [Shreya Dasgupta](#) on 5 June 2020



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100