

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ШТАММОВ SARS-CoV-2 МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Ибадуллаева Наргиз Сапиевна, Казакова Евгения Ивановна, Хикматуллаева Азиза Сайдуллаевна, Локтева Любовь Михайловна

Научно-исследовательский институт Вирусологии Республиканского специализированного научно-практического медицинского центра эпидемиологии, микробиологии, инфекционных и паразитарных заболеваний, Республика Узбекистан, г. Ташкент

ЦИРКУЛЯЦИЯЛОВЧИ SARS-CoV-2 ШТАММЛАРИНИ РЕАЛ ВАҚТ РЕЖИМИДАГИ ПЗР УСУЛИДА ИДЕНТИФИКАЦИЯЛАШ

Ибадуллаева Наргиз Сапиевна, Казакова Евгения Ивановна, Хикматуллаева Азиза Сайдуллаевна, Локтева Любовь Михайловна

Республика ихтисослаштирилган эпидемиология, микробиология, юкумли ва паразитар касалликлар илмий-амалий тиббиёт марказининг Вирусология илмий-тадқиқот институти, Ўзбекистон Республикаси, Тошкент ш.

IDENTIFICATION OF CIRCULATION SARS-CoV-2 STRAINS BY REAL-TIME PCR

Ibadullaeva Nargiz Sapievna, Kazakova Evgeniya Ivanovna, Khikmatullaeva Aziza Saydullaevna, Lokteva Lyubov Mikhaylovna

The Research Institute of Virology of the Republican specialized scientific practical medical center of epidemiology, microbiology, infectious and parasitic diseases, Republic of Uzbekistan, Tashkent

e-mail: drnargizis@gmail.com

Резюме. Реал вақт режимидаги ПЗР усулида циркуляцияловчи SARS-CoV-2 штаммларини аниқлаш маълумотларни тезкор олишида муҳим аҳамиятга эга. SARS-CoV-2 штаммларини аниқлаш учун 168 нафар бемордан тўпланган назофарингеал суртмалар ПЗР усулида ўрганилди. 2020 йилнинг апрел-май ойларида ёввойи SARS-CoV-2 штамми 69,0%, 2020 йилнинг июн-август ойларида эса 96,4% ҳолатларда аниқланди. Аммо, пандемия бошланганидан 3 ой ўтгач, ёввойи штаммининг 484E мутациясининг аниқланиши 1,4 баробарга ошиш тенденцияси кузатилди. Реал вақт режимидаги ПЗРдан фойдаланиш SARS-CoV-2 вариантлари тарқалиш динамикаси бўйича маълумотларни тезкор олишни таъминловчи вирусологик мониторинг воситаси бўлиб хизмат қилиши мумкин.

Калит сўзлар: SARS-CoV-2, COVID-19, ПЗР, мутация, штамм.

Abstract. Detection of circulating SARS-CoV-2 strains by real-time PCR is important for rapid data acquisition. To identify SARS-CoV-2 strains, nasopharyngeal swabs collected from 168 patients by PCR were studied. In April-May 2020, detection of the wild type of SARS-CoV-2 was noted in 69,0% of cases, and in June-August 2020 in 96,4% of cases. However, 3 months after the start of the pandemic, there was a trend towards an increase in the detection of the wild type of SARS-CoV-2 with the 484E mutation by 1.4 times. The use of real-time PCR can serve as a tool for virological monitoring, providing prompt receipt of data on the dynamics of the spread of SARS-CoV-2 variants.

Key words: SARS-CoV-2, COVID-19, PCR, mutation, strain.

Актуальность. В январе 2020 года Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) объявила вспышку эпидемии, связанной с SARS-CoV-2, чрезвычайной ситуацией международного значения в области здравоохранения, а 11 марта 2020 года охарактеризовала принявшее мировой масштаб распространения заболевания как пандемию COVID-19 [8]. По состоянию на 10 марта 2023 года в мире подтверждено 676 609 955 случаев заражения и 6 881 955 случаев летальных исходов от COVID-19 [6]. В целом по миру больше половины случаев заболевания пришлось на США, Индию, Бразилию, Соединённое Королевство, Россию и Францию. В Республике Узбекистан первый случай новой коронавирусной инфекции COVID-19 был выявлен 15 марта 2020 года. По

состоянию на 10 марта 2023 года в Узбекистане зарегистрировано 251247 случаев COVID-19 [6]. ВОЗ стараясь не использовать географическую привязку в названиях штаммов SARS-CoV-2 с мая 2021 года приняла решение обозначать их буквами греческого алфавита и тем самым исключаются именованья «британский», «бразильский» и др., связанные с названиями тех стран, где были впервые обнаружены соответствующие штаммы. К штаммам с высокой трансмиссивностью и летальностью относятся Альфа, Бета, Гамма и Дельта, а штамм Омикрон отличается высокой трансмиссивностью, однако при этом низкой летальностью. ВОЗ на регулярной основе проводит оценку влияния штаммов SARS-CoV-2 на трансмиссивность вируса, клиническую картину и тяжесть

заболевания и их воздействие на медицинские меры вмешательства и рекомендует внедрение эпидемиологического надзора и геномного секвенирования для получения репрезентативных данных об интенсивности распространения вариантов SARS-CoV-2 с учетом местных условий. В связи с этим изучение циркулирующих штаммов SARS-CoV-2 в настоящее время является актуальным.

Цель исследования. Определение циркулирующих штаммов SARS-CoV-2 с применением метода ПЦР в режиме реального времени.

Материал и методы. Для идентификации штаммов SARS-CoV-2 исследованы назофарингеальные мазки собранные у 168 пациентов, госпитализированных в клинику НИИ Вирусологии в период с апреля по август 2020 года с диагнозом COVID-19. Из 168 назофарингеальных мазков 84 образца были собраны в апреле-мае 2020 г. и 84 образца в июне-августе 2020 г. Все назофарингеальные мазки до проведения исследования хранились в морозильной камере при температуре минус 80°C. Экстракцию РНК SARS-CoV-2 проводили с использованием набора реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (Россия) согласно инструкции производителя. Определение штаммов SARS-CoV-2 проводили с использованием набора ViroQSC2 Variant 1 и ViroQSC2 Variant 2 (Германия) методом ПЦР в режиме реального времени согласно инструкции производителя. Набор ViroQSC2 Variant 1 предназначен для определения Alpha (B.1.1.7); Beta (B.1.351); Gamma (P.1); Zeta (P.2); B.1.28 линий и E484K, 484E, N501Y и V1176F мутаций. Набор ViroQSC2 Variant 2 предназначен для идентификации Alfa (B.1.1.7); Delta (B.1.617.2); Epsilon (B.1.427/B.1.429); State (B.1.525); Kappa (B.1.617.1); B.1.617.3 линий и L452R, E484Q, P681R и Del69-70 мутаций. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием критерия Хи-квадрат.

Результаты и обсуждение. Для выявления циркулирующих штаммов SARS-CoV-2 методом ПЦР в режиме реального времени идентифицировали 84 образца собранных в апреле-мае 2020 г. и 84 образца собранных в июне-августе 2020 г. Анализ результатов исследований, собранных в апреле-мае 2020 г., показал преобладание дикого штамма SARS-CoV-2. Дикий штамм подтверждался при наличии мутации 484E которая была выявлена в 69,0% образцах. При исследовании образцов, собранных в июне-августе месяцах 2020 г. была обнаружена тенденция к увеличению выявления дикого штамма SARS-CoV-2, который был идентифицирован в 96,4% случаев. Следует отметить, что к

августу 2020 г. по сравнению с апрелем 2020 г., частота выявления дикого штамма SARS-CoV-2 с мутацией 484E увеличилась в 1,4 раза ($p < 0,001$).

Ранее в Узбекистане было проведено 2 полногеномных исследования SARS-CoV-2. Первое исследование было проведено в конце 2020 г. на 32 образцах (18 сиквенсов высокого качества) в Центре Геномики и Биоинформатики при Академии Наук Республики Узбекистан. Второе исследование было проведено летом 2021 г. на 48 образцах (39 сиквенсов высокого качества) в Центре Передовых Технологий при Министерстве Инновационного развития Республики Узбекистан. При секвенировании образцов, собранных с октября по начало декабря 2020 года выявлены в общей сложности 128 SNP, состоящих из 45 общих и 83 уникальных мутаций [3]. Абдуллаев А. и соавторы в образцах, собранных в июле 2021 г. выявили в общей сложности 223 вариации на уровне нуклеотидов, включая SNP и 34 делеции в разных позициях по всему геному SARS-CoV-2 [1].

В нашем исследовании при использовании метода ПЦР в режиме реального времени выявление дикого штамма SARS-CoV-2 было характерно для периода начала пандемии COVID-19 в Узбекистане (апрель-август 2020 г.). Характерная для дикого типа мутация 484E была выявлена в 69,0% образцов собранных в апреле-мае 2020 г. Однако спустя 3 месяца после начала пандемии наблюдалась тенденция к увеличению выявления дикого штамма SARS-CoV-2 с мутацией 484E с 69,0% до 96,4% случаев ($p < 0,001$).

Быстрое обнаружение вариантов SARS-CoV-2 является сложной задачей. Идентификация штаммов SARS-CoV-2 посредством секвенирования занимает много времени, требует специального оборудования и является дорогостоящим методом исследования. Применение ПЦР для скрининга значимых генетических вариантов SARS-CoV-2 предлагается как альтернативный метод [4]. В некоторых исследованиях были обнаружены варианты SARS-CoV-2 с использованием обычной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) [2, 9]. Hyun Jin Kim и соавторы подтвердили, что общая степень соответствия между ПЦР набором "PowerChek" для обнаружения мутаций S-гена SARS-CoV-2 и секвенированием составила 100% и авторы предлагают использовать данный набор для скрининга вариантов SARS-CoV-2 [5]. Аналогично показано, что дифференциация вариантов SARS-CoV-2 с помощью ОТ-ПЦР была высокоэффективной при ретроспективных исследованиях и отражали национальные эпидемиологические тенденции по распространенности заболевания и вариантов вируса [7]. Исследования, направленные на

изучение разнообразия вариантов SARS-CoV-2 позволят получать репрезентативные данные об интенсивности распространения штаммов SARS-CoV-2 в регионе.

Выводы. Использование метода ПЦР для идентификации штаммов SARS-CoV-2 является экономичной и быстрой альтернативой методу секвенирования, однако, для идентификации штаммов вируса проведение полногеномного секвенирования является золотым стандартом. Применение ПЦР в режиме реального времени может служить инструментом вирусологического мониторинга, обеспечивая оперативное получение данных по динамике распространения вариантов SARS-CoV-2 и значимых мутаций вируса вызывающих озабоченность. Быстрое выявление таких вариантов позволяет своевременно реагировать на изменение эпидемиологической ситуации и выбрать оптимальные стратегии в области здравоохранения.

Литература:

1. Alisher Abdullaev., Abrorjon Abdurakhimov., Zebinisa Mirakbarova., Shakhnoza Ibragimova., Vladimir Tsoy. et al. Genome sequence diversity of SARS-CoV-2 obtained from clinical samples in Uzbekistan // PLoS One. – 2022. – Vol.17(6): e0270314. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270314>.
2. Antonin Bal., Gregory Destras., Alexandre Gaymard., Karl Stefic., Julien Marlet. et al. Two-step strategy for the identification of SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 and other variants with spike deletion H69–V70, France, August to December 2020 // <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.3.2100008>.
3. Ayubov M.S., Buriev Z.T., Mirzakhmedov M.K., Yusupov A.N., Usmanov D.E., Shermatov S.E. et al. // Profiling of the most reliable mutations from sequenced SARS-CoV-2 genomes scattered in Uzbekistan. PLoS One. - 2022. – Vol.17(3):e0266417. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266417>.
4. European Centre for Disease Prevention and Control, WHO Regional Office for Europe. Methods for the detection and identification of SARS-CoV-2 variants // ECDC and WHO Regional Office for Europe: Stockholm and Copenhagen. - 3 March 2021. – 14 p.

5. Hyun Jin Kim., Seon Young Kim., Gye Cheo Kwon., Qute Choi. Detecting spread of SARS-CoV-2 variants using PowerChek SARS-CoV-2 S-gene mutation detection kit // J Clin Lab Anal. – 2022. – Vol. 36(8):e24567. <https://doi.org/10.1002/jcla.24567>.
6. Johns Hopkins University // Coronavirus resource center. <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>.
7. Karolina Wegrzynska., Magdalena Komiazyk., Jaroslaw Walory., Aleksandra Kozinska., Izabela Wasko., Anna Baraniak. Differentiation of SARS-CoV-2 Variants Using RT-qPCRs by Targeting Recurrent Mutation Sites: A Diagnostic Laboratory Experience from Multi-Center Regional Study, August 2020–December 2021 // Poland. Int. J. Mol. Sci. – 2022. – 23, 9416. <https://doi.org/10.3390/ijms23169416>.
8. Novel Coronavirus(2019-nCoV): Situation Report, 11 // World Health Organisation. 31 January 2020. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/330776>.
9. Stéphanie Haim-Boukobza., Bénédicte Roquebert., Sabine Trombert-Paolantoni., Emmanuel Lecorche., Laura Verdurme. et al. Detecting Rapid Spread of SARS-CoV-2 Variants, France, January 26 February 16, 2021 // Emerging Infectious Diseases. - Vol. 27, No. 5. - May 2021. – P. 1496-1499.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ШТАММОВ SARS-CoV-2 МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Ибадуллаева Н.С., Казакова Е.И., Хикматуллаева А.С., Локтева Л.М.

Резюме. Определение циркулирующих штаммов SARS-CoV-2 с применением метода ПЦР в режиме реального времени важно для оперативного сбора данных. Для идентификации штаммов SARS-CoV-2 исследованы методом ПЦР назофарингеальные мазки, собранные у 168 пациентов. В апреле-мае 2020 г., выявление дикого штамма SARS-CoV-2 отмечалось в 69,0% случаев, а в июне-августе месяце 2020 г. в 96,4% случаев. Однако спустя 3 месяца после начала пандемии наблюдалась тенденция к увеличению выявления дикого штамма SARS-CoV-2 с мутацией 484E в 1,4 раза. Применение ПЦР в режиме реального времени может служить инструментом вирусологического мониторинга, обеспечивая оперативное получение данных по динамике распространения вариантов SARS-CoV-2.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, COVID-19, ПЦР, мутация, штамм.