

ГЕНЕТИЧНА ВАРІАБЕЛЬНІСТЬ SARS-COV-2 В МІЖПІКОВИЙ ПЕРІОД

М'ясоєдов¹ В. В., Нартов² П. В., Юрко¹ К. В.,
Лісовий¹ В. М., Капустник¹ В. А., Бондаренко¹ А.
В., Черняк¹ М. Є., Якущенко³ В. А., Маслово² В.
С., Бондаренко² О. В.

¹Харківський національний медичний
університет, Харків, Україна,

²КНП ХОР «Обласна клінічна інфекційна
лікарня» Харків, Україна,

³Національний фармацевтичний університет,
Харків, Україна.

Вступ. SARS-CoV-2 належить до РНК-вірусів, для яких характерна висока частота мутацій. ВООЗ спільно з експертними мережами, національними органами та дослідницькими колами проводить моніторинг та оцінку еволюції вірусу SARS-CoV-2 для виявлення його значних змін. Деякі мутації впливають на властивості вірусу, наприклад, здатність до поширення та пов'язаний з цим рівень контагіозності, ступінь тяжкості захворювання та летальність або ефективність вакцин, терапевтичних препаратів, засобів діагностики чи інших медико-санітарних і соціальних заходів. У даний час відсутня єдина номенклатурна система, й у світі визнані для іменування та відстеження генетичних ліній SARS-CoV-2 класифікації від Nextstrain [<https://nextstrain.org/>], GISAID [<https://www.gisaid.org/>] та Pango [<https://cov-lineages.org/>].

Поява в кінці 2020 р. нових варіантів вірусу, що стали джерелом підвищеного ризику для глобального громадського здоров'я, підштовхнула ВООЗ до прискореного проведення класифікації окремих варіантів, що викликають інтерес (VOI), і варіантів, що викликають занепокоєння (VOC), щоб забезпечити пріоритетну увагу в контексті всесвітнього моніторингу. Наразі експертна група, скликана ВООЗ, рекомендувала використовувати букви грецького алфавіту для маркування варіантів вірусу, щоб уникнути стигматизації та для полегшеного й практичного обговорення громадськістю та швидкого реагування на відповідний варіант і для профілактики його поширення [1].

На даний момент ВООЗ оголосила чотири варіанти VOC, а саме:

– Альфа: лінія 20I (V1) [Nextstrain], GRY (раніше GR/501Y.V1) [GISAID], B.1.1.7 [Pango] з'явився у Сполученому Королівстві у вересні 2020 року з доказами підвищеної передачі та вірулентності. Відомі мутації включають N501Y, E484K та P681H.

– Бета: лінія 20H (V2) [Nextstrain], GH/501Y.V2 [GISAID], B.1.351 (Pango) з'явився в Південній Африці в травні 2020 року з доказом збільшення трансмісії та змін антигенності, при цьому деякі дослідники не виключають його вплив на

ефективність деяких вакцин. Відомі мутації включають N501Y, E484K та K417N.

– Гамма: лінія 20J (V3) [Nextstrain], GR/501Y.V3 [GISAID], P.1 (Pango) з'явився в Бразилії в листопаді 2020 року, також є докази підвищеної передачі та вірулентності, поряд зі змінами антигенності. Були висловлені побоювання щодо ефективності існуючих вакцин. Відомі мутації включають N501Y, E484K та K417N.

– Дельта: лінія 21A [Nextstrain], G/478K.V1 [GISAID], B.1.617.2 (Pango) з'явився в Індії в жовтні 2020 року. Існують дані про збільшення передачі та зміни антигенності. Віднесений до VOI 4 квітня 2021 р., до VOC – 11 травня 2021 р.

Мета цієї роботи – визначення варіантів вірусу SARS-CoV-2 в міжпіковий період (до початку нової хвилі) у хворих м. Харкова та області з підтвердженою інфекцією SARS-CoV-2.

Матеріали та методи. Для проведення дослідження були використані мазки (40 назофарингеальних зразків) від пацієнтів з симптомами ГРВІ або підозрою на COVID-19, які були шпиталізовані до КНП ХОР «Обласна клінічна інфекційна лікарня» в червні 2021 року та які були ідентифіковані як позитивні на наявність SARS-CoV-2.

У червні 2021 року в КНП ХОР «Обласна клінічна інфекційна лікарня» перебувало 352 хворих на COVID-19. Проведено крос-секційне дослідження виявлення варіантів SARS-CoV-2, що циркулювали на території Харківської області в червні 2021 року. За методом систематичної імовірнісної вибірки для дослідження генетичної варіабельності SARS-CoV-2 було відібрано 40 хворих на COVID-19. Критеріями залучення пацієнтів у дослідження були: позитивний результат ПЛР, письмова згода на участь у дослідженні.

Серед досліджених хворих переважали особи жіночої статі – 25 осіб проти 15, відповідно. Середній вік хворих склав 60,4 років (мінімальний – 25 років, максимальний – 91 рік). Віковий розподіл серед досліджених хворих (за класифікацією ВООЗ 2001 року) був наступним: особи молодого віку (18 – 44 років): 6 (15 %), з них чоловіків 4 та жінок 2; середнього віку (45 – 59 років): 9 (22,5 %), з них чоловіків 1 та жінок 8; похилого віку (60 – 74 років): 21 (52,5 %), з них чоловіків 9 та жінок 12; старечого віку (75 – 90 років): 3 (7,5 %), з них чоловіків 1 та жінок 2; довгожителів: 1 жінка (2,5 %). Тобто основною уразливою категорією були особи похилого та середнього віку.

Всі хворі були шпиталізовані за наявності дихальної недостатності, але позашпитальна пневмонія була візуалізована інструментально (комп'ютерна томографія, рентгенографія, ультразвукове дослідження) в 38 хворих. III клінічна група була встановлена у 21 хворого, IV клінічна група – 17.

У пацієнтів, залучених у дослідження, клінічна картина характеризувалася наступними проявами: виражена загальна слабкість в 37 (92,5 %),

біль голови – у 35 (87,5 %), біль у горлі – у 36 (90 %), сухий кашель – у 33 (82,5 %), закладеність носа – у 32 (80 %), відсутність смаку та нюху – в 27 (67,5 %), підвищення температури тіла до фебрильних цифр – у 29 (72,5 %), задишку – в 10 (47,5 %) пацієнтів. Клінічні симптоми ураження нервової системи спостерігали у 31 (77,5 %) пацієнта та характеризувалися порушенням сну, тривожністю, занепокоєнням, суїцидальними думками, депресією. Летальність серед дослідженої групи склала 15 %.

Для первинної ідентифікації використовували метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в реальному часі, який проводили за допомогою діагностичного набору «Biosoge® SARS-CoV-2» («ТОВ «Біокор Текнолоджі ЛТД», Україна) відповідно до інструкції виробника [2]. Набір дозволяє проводити детекцію гена ORF1ab SARS-CoV-2 та гена N SARS-CoV-2. Зразок вважали позитивним за наявності сигналу за будь-яким з генів. Всі використані в роботі зразки містили вірусну РНК у високій концентрації.

Для вторинної ідентифікації використовували набір реагентів для виявлення РНК коронавірусу 2019-nCoV методом ПЛР SNPsig® VariPLEX™ (Covid-19) («Primerdesign™ Ltd.», Великобританія). SNPsig® VariPLEX™ (Covid-19) – це мультиплексний аналіз, призначений для алейного виявлення SARS-CoV-2 вірусів: альфа – 20I/501Y.V1, бета – 20H/501Y.V2, гамма – 20J/501Y.V3 і епсилон – 20C/S.452R (в минулому), а також біологічно значущі мутації E484K і N501Y. Варіант 20C/S.452R був ідентифікований в США в травні 2020 року та з 5 травня 2021 був віднесений до VOI під маркуванням епсилон. В теперішній час класифікується як лінія 21C [Nextstrain], GH/452R.V1 [GISAID], B.1.427/B.1.429 (Pango) та виключений із VOI 6 липня 2021 року.

SNPsig® VariPLEX™ (Covid-19) складається з 3 праймерів та зондів –флюорофорів (див. таб. 1). Для того, щоб праймери залишалися специфічними для виявлення геномів SARS-CoV-2, Primerdesign™ Ltd. переглядають послідовність SARS-CoV-2 (всі варіанти) в базі даних GISAID EpiCoV [3].

Таблиця 1. Праймери та зонди SNPsig® VariPLEX™ (Covid-19)

Праймер	Канал флюоресценції			
	FAM	VIC	ROX	Cy5
VariPlex™ пробірка 1 (праймер для E484K та 20I/501Y.V1)	E484K WT	E484K MUT	20I/501Y.V1 WT	20I/501Y.V1 MUT
VariPlex™ пробірка 2 (праймер для 20H/501Y.V2 та 20J/501Y.V3) та внутрішній контроль	WT	20H/501Y.V2 MUT	20J/501Y.V3 MUT	Внутрішній контроль
VariPlex™ пробірка 3 (праймер для 20C/S.452R)	N501Y WT	N501Y MUT	20C/S.452R WT	20C/S.452R MUT

Примітка. WT – послідовність характерна для оригінального штаму, MUT – послідовність характерна для мутантного штаму

Результати

Вважається, що генетична послідовність hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019 є початковим варіантом вірусу, відомим як «нульова генетична послідовність» [4]. В Україні пік першої хвилі припав на листопад-грудень 2020 року, що був обумовлений оригінальним вірусом, в той час як пік другої хвилі (переважно обумовлений варіантом 20I/501Y.V1) прийшовся на травень-квітень 2021 року (див. рис. 1) [5].

При проведенні ПЛР дослідження на варіанти вірусу SARS-CoV-2, що циркулюють в м. Харків та області в міжпіковому періоді (перед початком третьої хвилі) було виявлено переважну циркуляцію варіанту 20I/501Y.V1 (альфа). Варіант-альфа був виявлений в 35 хворих (87,5%) з характерною для цього вірусу мутацією N501Y, але в 1-го хворого було детектовано наявність додаткових мутацій. В 5-ох хворих (12,5%) виявлений

оригінальний вірус SARS-CoV-2, але в 1-го з них з наявністю мутації N501Y. В усіх мешканців районів області виявлена циркуляція лише варіанту 20I/501Y.V1. Циркуляція варіантів SARS-CoV-2 20H/501Y.V2 (бета), 20J/501Y.V3 (гамма), 20C/S.452R (колишній епсилон) не була виявлена в м. Харкові та області, також не була виявлена мутація E484K в жодного хворого.

Таким чином, домінуючим варіантом, який циркулював в міжпіковий період в м. Харкові та області є варіант альфа, який превалує над оригінальним вірусом завдяки збільшеному рівню контагіозності та більш швидкому поширенню. Вважається, що це, принаймні частково, пов'язано з мутацією N501Y (заміна аспарагіну тирозином в амінокислотній позиції 501) всередині рецептор-зв'язуючого домену спайкового глікопротеїну, який необхідний для зв'язування з ACE2 рецептором в клітинах людини. Мутація N501Y збільшує ефективність взаємодії вірусного білка з рецептором клітини [6].

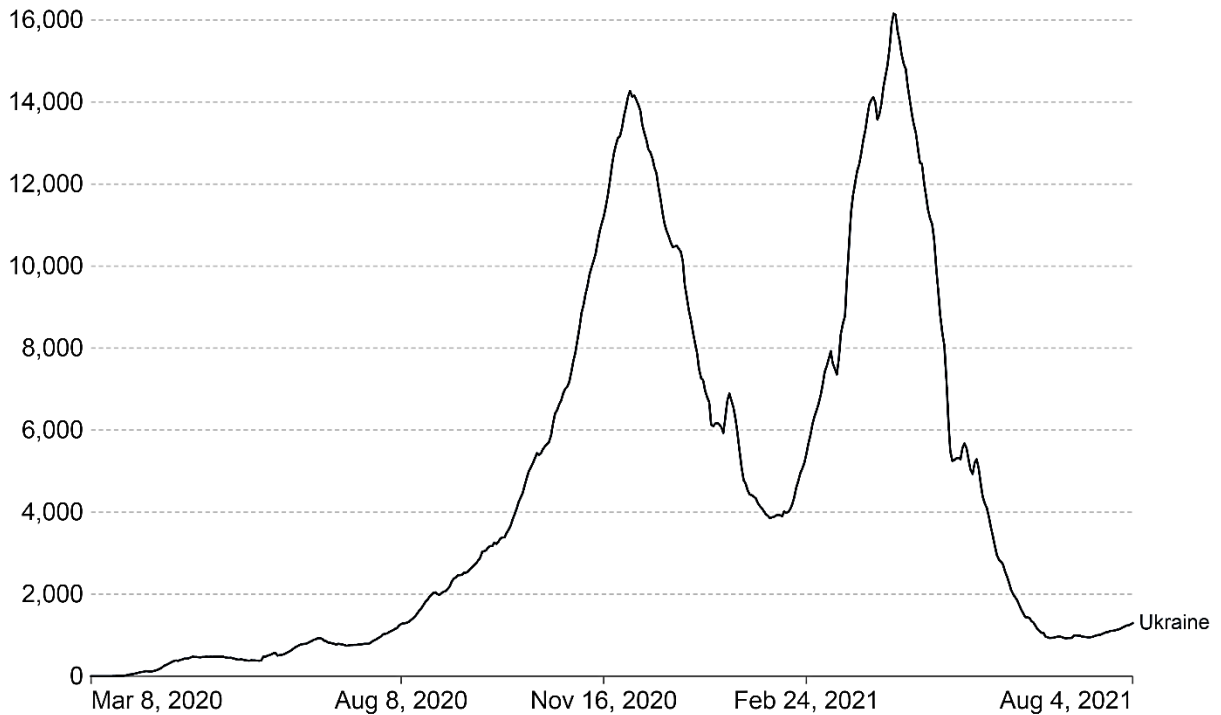


Рис. 1. Підтвержені випадки COVID-19 в Україні.

Генетичні варіанти SARS-CoV-2 з'являються та циркулюють по всьому світу протягом усієї пандемії COVID-19. З початку пандемії застосувалися технології секвенування для виявлення мутацій, які змінюють характеристики SARS-CoV-2, включаючи мутації, що змінюють контагіозність [7]. Наприкінці 2020 року варіант 201/501Y.V1 змінив інші циркулюючі штами в декількох регіонах та призвів до другої хвилі в Україні в травні-квітні 2021 року. Мутація N501Y також була виявлена в інших варіантах VOC GH/501Y.V2 (бета) та GR/501Y.V3 (гама), а крім того, в GH/452R.V1 (в минулому епсилон).

Поява нових VOC викликає необхідність нових рішень для виявлення цих варіантів вірусу через клінічні наслідки, пов'язані з лікуванням та стійкістю до вакцин. Спостереження за процесом мутації SARS-CoV-2 за допомогою технологій секвенування, що є центральною в ідентифікації VOC, дуже повільне та складне через тривалість секвенування та інтерпретації цих результатів. В швидкоплинній діагностичній обстановці, де, як вважається, VOC несе відповідальність за спалах, підходи на основі ПЛР в режимі реального часу можуть бути використані для швидкого виявлення цих варіантів та біологічно значущих мутацій з додатковою перевагою в швидкості, дешевизні та більш легкою реалізацією в широкому діапазоні клінічної практики.

Висновки

Домінуючим варіантом, який циркулював в м. Харкові та області в між піковий період є варіант альфа, який превалує над оригінальним вірусом завдяки збільшеному рівню контагіозності та більш швидкому поширенню.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of Interest: authors have no conflict of interest to declare.

SARS-COV-2 genetic variability in the inter-peak period

Myasoedov V. V., Nartov P. V., Yurko K. V., Lisovyi V. M., Kapustnyk V. A., Bondarenko A. V., Cherniak M. E., Yakushchenko V. A., Maslova V. S., Bondarenko O.V.

The aim of the study – to determine the variants of SARS-CoV-2 virus in the inter-peak period (before the beginning of the new wave) in patients of Kharkiv and Kharkiv region with confirmed SARS-CoV-2 infection.

Materials and methods. The smears (40 nasopharyngeal samples) from patients with symptoms of ARVI or suspected COVID-19, who were hospitalized to MNE KRC "Regional clinical infectious diseases hospital" in June 2021 and who were identified as positive for SARS-CoV-2 were used study for research conducting. Cross-sectional study of the detection of variants of SARS-CoV-2 circulating in the Kharkiv region in June 2021 was conducted. According to the method of systematic probabilistic sampling for the study of genetic variability of SARS-COV-2, 40 patients with COVID-19 were selected. Among the studied patients, females predominated – 25 people against 15, respectively. The average age of patients was 60.4 years (minimum - 25 years, maximum - 91 years). All patients were hospitalized in the presence of respiratory failure, but community-acquired pneumonia was visualized instrumentally (computed tomography, radiography, ultrasound) in 38 patients. Clinical group III was established in 21 patients, clinical group IV – in 17. Mortality among the studied group was 15%.

Research results. The predominant circulation of variant 201/501Y.V1 (alpha) was detected during PCR

studies on variants of SARS-CoV-2 virus circulating in Kharkiv and the Kharkiv region in the inter-peak period (before the beginning of the third wave). Alpha variant was detected in 35 patients (87.5%) with typical for this virus mutation – N501Y, but the presence of additional mutations was identified in 1 patient. The original SARS-CoV-2 virus was detected in 5 patients (12.5%), but in 1 of them with the presence of the N501Y mutation. Circulation of only variant 201/501Y.V1 was detected in all residents of the region. Circulation of SARS-CoV-2 variants 20H/501Y.V2 (beta), 20J/501Y.V3 (gamma), 20C/S.452R (previously epsilon) was not detected in Kharkiv and the region, and the E484K mutation was not found in any patient.

Conclusions. The dominant variant circulating in Kharkiv and the region in the inter-peak period is the alpha variant, which prevails over the original virus due to the increased level of contagiousness and more rapid spread.

Key words: COVID-19, SARS-COV-2, genetic variability.

References

1. World Health Organization. Tracking SARS-CoV-2 variants. Last updated 23 July 2021. URL: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants> (дата звернення: 02.08.2021).
2. Набір діагностичний «Biocore® SARS-CoV-2» для виявлення РНК коронавірусу SARS-CoV-2 методом ЗТПЛР у реальному часі: Редакція №10 від 21.04.2021. URL: https://biocor-tech.com/wp-content/uploads/2021/04/biocore-sars-cov-2_100.pdf
3. SNPsig® VariPLEX™ (Covid-19) D00060 IFU Issue 1 Published Date: 26th March 2021 Primerdesign Ltd. URL: https://genesig.com/assets/files/SNPsig_VariPLEX_Covid_19_IFU_Issue_1_1.pdf
4. Zhukova A., Blassel L., Lemoine F., et al. (2020). Origin, evolution and global spread of SARS-CoV-2. *C R Biol.* 2020 Nov 24. doi: 10.5802/crbio.29.
5. Daily new confirmed COVID-19 cases per million people. COVID-19 Data Repository by the Center for Systems Science and Engineering at Johns Hopkins University. Last updated 23 July 2021. URL: <https://github.com/CSSEGISandData/COVID-19>.
6. Davies N.G., Abbott S., Barnard R.C. et al. (2021). “Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England”. *Science.* 372 (6538): eabg3055. DOI:10.1126/science.abg3055.
7. V'kovski P., Kratzel A., Steiner S. et al. (2020) Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol.* 2020 Oct 28; P. 1–16. URL: www.nature.com/nrmicro.