

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ВИРУСА SARS-CoV-2 НА ТЕРРИТОРИИ г. МИНСКА В ФЕВРАЛЕ — МАЕ 2021 года

Булда К. Ю.¹, Гасич Е. Л.¹, Коско А. Д.¹, Бунас А. С.¹, Клойко Н. Л.²

¹Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», г. Минск, Республика Беларусь;

²Учреждение здравоохранения «Городская детская инфекционная клиническая больница», г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Альфа-вариант (классификация Pango B.1.1.7) вируса SARS-CoV-2 был впервые обнаружен на юго-востоке Англии в сентябре 2020 г. и к концу декабря 2020 г. стал доминирующим вариантом в мире. Экспертами Всемирной организации здравоохранения он был отнесен к вариантам, вызывающим обеспокоенность, которые из-за дополнительных мутаций обладают биологическими свойствами, повышающими контагиозность, патогенность и/или снижающими нейтрализующую активность антител. Начиная с 2020 г. в Республике Беларусь проводятся исследования, позволившие изучить молекулярно-генетическое разнообразие SARS-CoV-2.

Целью исследования было определение особенностей распространения альфа-варианта (B.1.1.7) SARS-CoV-2 в 2021 г. в г. Минске.

Показано, что первые случаи заражения альфа-вариантом в Минске зарегистрированы в феврале 2021 г., распространение которых с февраля по апрель увеличилось с 11,9 до 72,0 %. В конце мая отмечено резкое снижение доли варианта Альфа до 60,3 %, что связано с появлением нового варианта вируса SARS-CoV-2 — Дельта.

Ключевые слова: вирус SARS-CoV-2, альфа-вариант (B.1.1.7), ОТ-ПЦР, секвенирование.

Введение. В конце января 2020 г. Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) была объявлена вспышка коронавирусной инфекции, ставшая чрезвычайной ситуацией в области здравоохранения. 11 февраля 2020 г. Международный комитет по таксономии вирусов дал название новому коронавирусу «SARS-CoV-2», а ВОЗ дала название заболеванию «COVID-19» (Coronavirus Disease 2019). В последующем случаи COVID-19 были зарегистрированы в большинстве стран мира, которые на начальном этапе были связаны с поездками в Китайскую Народную Республику. Вследствие чего основное распространение получил вариант SARS-CoV-2, названный «уханьский», который впервые был выделен у пациентов из г. Ухань, который стал распространяться молниеносно во всех регионах мира. В результате эволюции появились мутации, которые привели к формированию его генетических вариантов, обладающих новыми свойствами. Для ряда из них было характерно более эффективное проникновение в клетки-хозяина, а также возможность ускользания из-под иммунного ответа. Одной из первых обнаружена мутация в положении D614G (замене аспарагиновой кислоты на глицин) в «европейском» варианте, который получил широкое распространение на территории стран Европы, а с марта 2020 г. стал доминирующим в мире. Для этого варианта были характерны более высокие значения вирусной нагрузки, а также трансмиссивность вируса [1].

Вариант Альфа (классификация по Pango B.1.1.7, клад по классификации GISAID GRY) вируса SARS-CoV-2 впервые был обнаружен на юго-востоке Англии в сентябре 2020 г. и к концу декабря 2020 г. он практически вытеснил ранее циркулирующие варианты. Это коррелировало со значительным увеличением частоты инфекций COVID-19, в связи с чем эксперты отнесли его к вариантам, вызывающим беспокойство (VOC) 202012/01. Вариант B.1.1.7 насчитывает 23 новые генетические мутации в сравнении с исходным вариантом коронавируса,

8 из которых расположены в S белке: Δ69/70, Δ144, N501Y, A570D, P681H, T716I, S982A и D1118H [2]. В частности, делеция тирозина (Y) в положении 144 S-белка, является частью структурного эпитопа NTD-специфического антитела 4A8. Эта делеция значительно снижает эффективность связывания с вируснейтрализующими антителами. Функциональные последствия наличия делеции гистидина (H) в положении 69 и валина в положении 70 (V) в N-концевом домене (NTD) S-белка SARS-CoV-2, пока не выявлены, однако предполагается, что данная делеция может также быть связана со способностью ускользать от иммунитета. Аминокислотная замена пролина на гистидин в положении P681H находится перед сайтом расщепления фурина, что оказывает влияние на процессинг фурина S-белка, который важен для слияния мембран и проникновения вируса [3]. Важна замена аспарагина (N) на тирозин (Y) в положении N501Y, расположенная в рецептор-связывающем мотиве (RBM). Она обеспечивает селективное преимущество для вируса за счет более эффективного связывания S-белка с человеческим ACE2 рецептором, облегчая проникновение вируса в клетки-хозяина. Схема расположения мутаций линии B.1 и ее сублиний в сравнении с вариантом B.1.1.7 представлена на рисунке 1 [4].

Стало понятно, что геномный надзор за циркулирующей генетических вариантов SARS-CoV-2 необходим для понимания не только текущей ситуации, но и раннего выявления вариантов с пандемическим потенциалом распространения.

Молекулярно-генетические исследования по изучению разнообразия и изменчивости SARS-CoV-2 были начаты в стране в конце 2020 г. Первые полученные результаты показали, что на территории страны циркулируют варианты B.1 и его сублиний [5]. С появлением нового варианта B.1.1.7 стала понятна необходимость расширения геномного надзора за новой коронавирусной инфекцией для оценки текущей ситуации в стране.

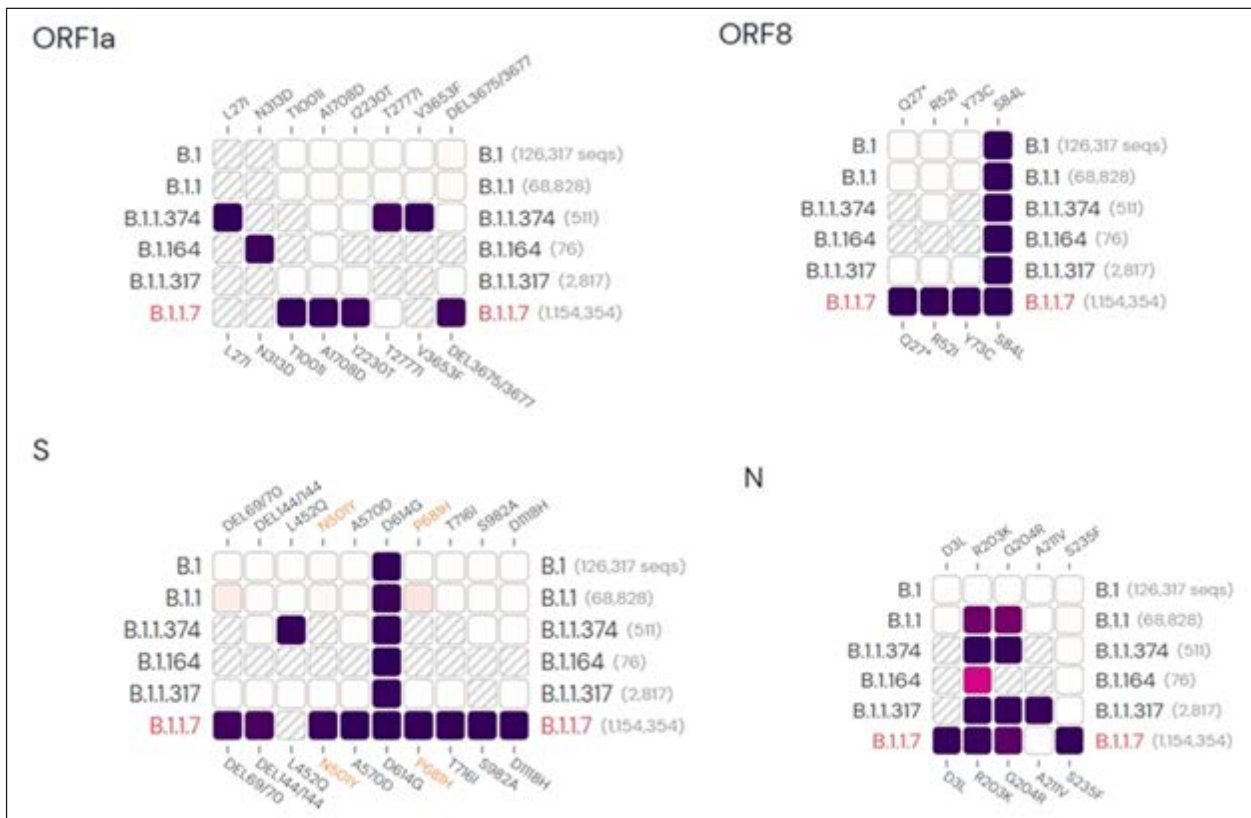


Рисунок 1 — Схема уникальных мутаций для вариант В.1 и его сублиний, циркулирующих в мире в 2020 — начале 2021 г. в сравнении с вариантом В.1.1.7

Цель работы — установить особенности распространения варианта Альфа (В.1.1.7) SARS-CoV-2 в 2021 г. на территории г. Минска.

Задачей исследования было выполнение молекулярно-генетического типирования РНК вируса SARS-CoV-2, выделенного из назофарингеальных мазков пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19, методом выявления однонуклеотидных полиморфизмов и анализа нуклеотидных последовательностей, полученных методом частичного секвенирования S участка гена вируса SARS-CoV-2 по Сэнгеру, циркулирующих в г. Минске в 2021 г.

Материалы и методы. Материал исследования был представлен назофарингеальными мазками, полученными от пациентов с подтвержденным COVID-19, проживающих на территории г. Минска в период февраль — май 2021 г. Экстракция РНК вируса SARS-CoV-2 проводилась методом этанольной преципитации. После экстракции РНК выполнялась реакция обратной транскрипции со смесью случайных гексамеров. Для

амплификации применялись следующие параметры: 25 °С — 10 мин, 54 °С — 40 мин, 85 °С — 5 мин, 4 °С — ∞. Полученная кДНК вируса SARS-CoV-2 использовалась для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с помощью амплификатора CFX96 Touch Real-Time PCR Bio-Rad. Для выявления однонуклеотидных полиморфизмов в области S гена (делеции 69/70 и замены N501Y) использовались праймеры: TCAACTCAGGACTTGTCTTACCT и TGGTAGGACAGGGTTATCAAAC (прямой и обратный для Δ69/70), HEX-TTCCATGCTATACATGTCTCTGGGAVHQ1 (с меткой для Δ69/70); CATATGGTTTCCAACCCACTA и GGTGCATGTAGAAGTTCAAAAGAAAGT (прямой и обратный для замены N501Y), ROX-TGGTGTGGTTACCAACCATACAGAGVHQ2 (с меткой для замены N501Y); GACCCCAAATCAGCGAAAT и TCTGGTACTGCCAGTTGAATCTG (прямой и обратный для детекции N гена SARS-CoV-2), FAM-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACCVHQ1 (с меткой для детекции N гена

SARS-CoV-2); AGATTTGGACCTGCGAGCG и GAGCGGCTGTCTCCACAAGT (прямой и обратный для детекции РНК-азы человека — внутренний контроль), Су5-ТТСТGACCTGAAGGCTCTGCGCG-BHQ (с меткой для детекции внутреннего контроля). Детекция делеции 69/70 и замены N501Y проводилась с помощью ПЦР в режиме реального времени со следующим режимом: 95 °С — 2 мин; 95 °С — 10 с, 55 °С — 30 с (40 циклов с детекцией по каналам: FAM, ROX, HEX, Су-5). Интерпретация результатов ПЦР производилась по сочетанию кривых флуоресценции, которые позволяют определить генетический вариант В.1.1.7 SARS-CoV-2. Образцы со значением Ct по каналу FAM больше 35 интерпретируются как отрицательные. Так как для варианта В.1.1.7 характерны Δ69/70 и замена N501Y, поэтому в образце с данным вариантом происходит подъем кривых флуоресценции по каналам FAM, HEX, ROX, Су-5 (возможна). Для вариантов линии В.1 и его сублиний наблюдается подъем кривых флуоресценции по каналам FAM и Су-5 (возможна).

Для секвенирования S участка генома вируса SARS-CoV-2 необходимо использовать образцы с высокой вирусной нагрузкой (значение Ct ≤ 25). Полученная ранее кДНК вируса SARS-CoV-2 используется для ПЦР. Для секвенирования S участка генома вируса использовались следующие праймеры: CCTTCACTGTAGAAAAGGAATC CATATGAGTTGTTGACATGTTTCAG (прямой, 22476 п.н. и обратный, 23543 п.н.). Размер продукта амплификации составил 1067 п.н. Полимеразная цепная реакция проводилась на амплификаторе Applied Biosystems Veriti 96-Well Thermal Cycler, с режимом: 95 °С — 2 мин; 95 °С — 10 с, 55 °С — 10 с, 72 °С — 1 мин 10 с (35 циклов); 72 °С — 5 мин; 4 °С — ∞.

Полученные амплифицированные фрагменты ДНК анализировали в 1,7%-м агарозном геле для проверки результата амплификации. Далее производилась очистка продуктов ПЦР с использованием метода ферментативной очистки. Секвенирующая ПЦР проводилась с использованием набора реагентов для секвенирования BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit и 2 мМ прямым и обратным праймерами к S участку гена вируса SARS-CoV-2. Электрофорез очищенных ацетатом

фрагментов после секвенирующей ПЦР проводился на генетическом анализаторе 3500 Genetic Analyzer. Анализ нуклеотидных последовательностей осуществлялся с использованием программного обеспечения Sequencing Analysis Software v.6, BioEdit v7.0.9.0, SeqScape v.3. Полученные нуклеотидные последовательности в формате fasta загружались на электронный ресурс (URL: <https://gisaid.org/database-features/covsurver-mutations-app/>) для получения списка мутаций в фрагментах S участка гена вируса SARS-CoV-2 для конкретного образца, что и позволяет определять генетический вариант.

Результаты и их обсуждение. В период с февраля по май 2021 г. в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии поступило 1282 образца из учреждений здравоохранения г. Минска с подтвержденным диагнозом COVID-19. Распределение пациентов по полу и возрасту представлено на рисунке 2. Для 27,7 % ($n = 356$) отсутствовала эпидемиологические данные.

Как видно из представленных данных, распределение было следующим: 42,7 % ($n = 395$) лица мужского пола и 57,33 % ($n = 531$) женского. Средний возраст пациентов составил $42,1 \pm 19,92$ лет. Среди мужчин 12,7 % младше 18 лет ($n = 50$), 12,2 % от 18 до 25 лет ($n = 48$), 17,5 % от 26 до 35 лет ($n = 69$), 18,0 % от 36 до 45 лет ($n = 71$) и 39,7 % более 45 лет ($n = 157$). Среди женщин 9,6 % младше 18 лет ($n = 51$), 10,7 % от 18 до 25 лет ($n = 57$), 16,6 % от 26 до 35 лет ($n = 88$), 16,6 % от 36 до 45 лет ($n = 88$) и 46,5 % старше 45 лет ($n = 247$). Таким образом, большинство лиц, включенных в исследование, было старше 45 лет (43,6 %, $n = 404$).

Распределение поступивших образцов из г. Минска по месяцам в 2021 г. имело следующую картину, в феврале — 363, в марте — 695, в апреле — 121, в мае — 103 образца. Поступившие образцы проходили мониторинг с использованием ПЦР в режиме реального времени для обнаружения варианта В.1.1.7. Из 1282 образцов, проанализированных методом ПЦР в режиме реального времени для обнаружения делеции 69/70 и аминокислотной замены N501, 13,2 %, были отрицательными или значение Ct для этих образцов было больше 35 ($n = 169$), 58,0 % являлись образцами, в которых была обнаружена РНК вируса SARS-CoV-2 по выходу

кривой флуоресценции по N участку гена вируса SARS-CoV-2 ($n = 743$), и 28,9 % были представлены образцами с $\Delta 69/70$ и заменой N501Y, характерными для варианта B.1.1.7

($n = 370$). Результаты молекулярно-генетических исследований позволили установить динамику распространения варианта Альфа на территории г. Минска (рисунок 3).

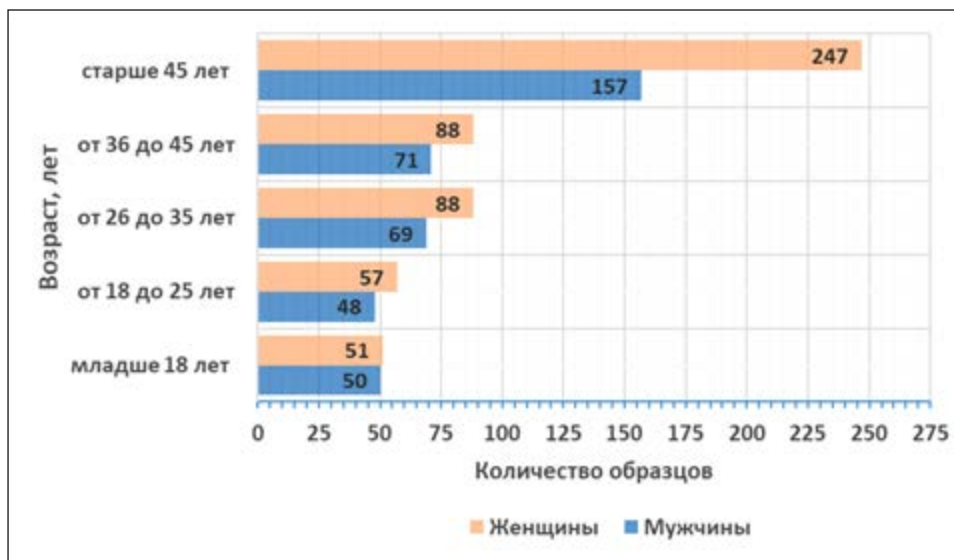


Рисунок 2 — Половозрастная структура выборки образцов в период с февраля по май 2021 г. из г. Минска

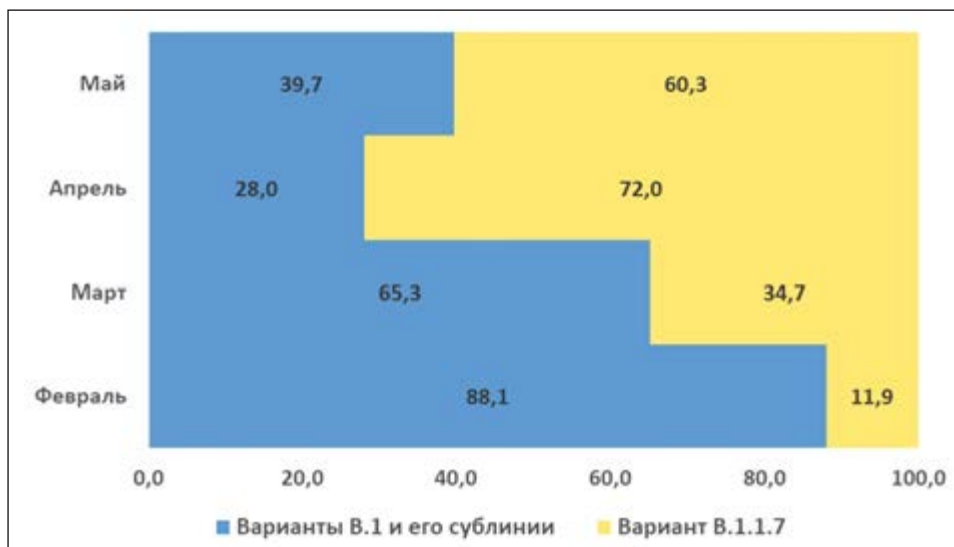


Рисунок 3 — Динамика распространения варианта Альфа в г. Минске в феврале — мае 2021 г.

Согласно полученным данным, первые случаи заражения вариантом Альфа были выявлены в г. Минске в конце февраля 2021 г. Так, его доля в феврале 2021 г. относительно всех исследованных положительных образцов составила 11,9 % ($n = 40$). В течение месяца произошло увеличение слу-

чаев заражения вариантом Альфа практически в 3 раза: с 11,9 до 34,7 % ($n = 206$).

В апреле он стал доминирующим вариантом и количество случаев заражения данным вариантом составило 72,0 % ($n = 77$). В мае 2021 г. отмечается падение доли представленности варианта Альфа до 60,3 %

($n = 47$). Напротив, на протяжении всех месяцев наблюдения доля варианта В.1 и его сублиний снижалась с 88,1 % в феврале до 39,7 % в мае.

Уменьшение доли варианта Альфа в структуре циркулирующих генетических вариантов SARS-CoV-2 в мае 2021 г. в г. Минске обусловлено завозом на территорию страны нового варианта — Дельта (В.1.617.2). Данный вариант быстро вытеснил ранее циркулирующие варианты за счет большей трансмиссивности и вирулентности. Практически сразу после его появления вариант Дельта был отнесен экспертами ВОЗ к группе вариантов, вызывающих обеспокоенность.

Несмотря на то что определение генетических вариантов вируса SARS-CoV-2 по наличию однонуклеотидных полиморфизмов и характерным для них аминокислотным заменам с помощью метода ПЦР в режиме реального времени достаточно хорошо показы-

вает себя для рутинной лабораторной диагностики. Однако в случае возникновения разновидностей вируса с отличными от искомого варианта мутациями имеется вероятность их пропуска. В связи с этим необходимо проведение генотипирования вируса с помощью методов секвенирования. Ограничением метода является низкая вирусная нагрузка. В нашем исследовании для генотипирования было отобрано 124 образца, которые имели высокое значение вирусной нагрузки ($Ct \leq 25$), с которыми выполнено частичное секвенирование S участка SARS-CoV-2 по Сэнгеру. Определение циркулирующих генетических вариантов проводили по идентификации уникальных мутаций в S участке характерных отдельных вариантов SARS-CoV-2: В.1.1.7 — N501Y и A570D, В.1.1.374 — L452Q, В.1.617.2 — L452R и T478K, В.1.404 — S477N, В.1.1.523 — E484K и S494P, В.1.525 — E484K, С.36.3 — R346S и L452Q. Схема их расположения представлена на рисунке 4.

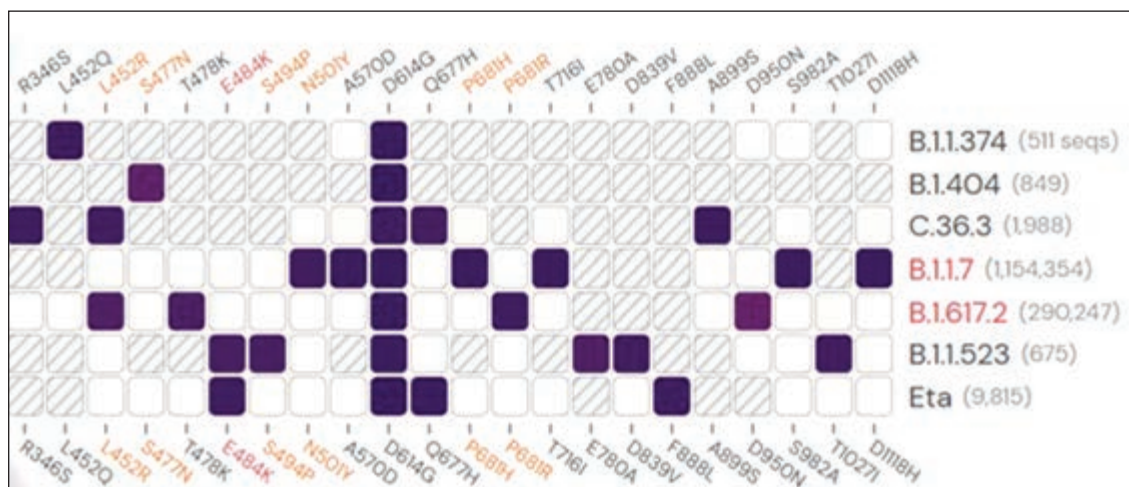


Рисунок 4 — Схема расположения уникальных аминокислотных замен в S участке вариантов вируса SARS-CoV-2

Результаты анализа нуклеотидов последовательностей с последующим биоинформационным анализом показало следующее: 69,4 % ($n = 86$) исследуемых последовательностей принадлежало к варианту Альфа, В.1.1.374 — 21,8 % ($n = 27$), В.1.617.2 — 4,0 % ($n = 5$), В.1.404 — 2,4 % ($n = 3$), и по 0,81 % для каждого из вариантов В.1.1.523 ($n = 1$), В.1.525 ($n = 1$), С.36.3 (В.1.1.1.36.3) ($n = 1$).

Результаты генотипирования подтвердили тенденцию распространения варианта

Альфа в г. Минске. Так, в марте ($n = 61$) вариант Альфа выявлен в 59,0 % ($n = 36$) случаев. Вторым по встречаемости был вариант В.1.1.374 — 34,4 % ($n = 21$), широко распространенный в 2020 г. в мире в нашей стране, замещенный впоследствии вариантом Альфа. На долю варианта В.1.404 (сублиния В.1) приходилось 4,9 % ($n = 3$) случаев.

В апреле из секвенированных ($n = 30$) образцов на вариант В.1.1.7 приходилось

86,7 % ($n = 26$) и 13,3 % В.1.1.374 ($n = 4$). В мае среди секвенированных образцов ($n = 22$) наблюдалось следующее распределение: В.1.1.7 — 59,1 % ($n = 13$), В.1.1.374 — 9,1 % ($n = 2$), В.1.617.2 — 22,7 % ($n = 5$), В.1.1.523 — 4,5 % ($n = 1$), С.36.3 — 4,5 % ($n = 1$).

Таким образом, была установлена динамика распространения варианта Альфа и других генетических вариантов вируса SARS-CoV-2 в г. Минске в феврале–мае 2021 г. Показано его быстрое распространение в течение двух месяцев с вытеснением ранее присутствующих вариантов на территории г. Минска.

Неожиданной находкой в ходе проведения работы стал вариант В.1.525 (Eta), согласно классификации, предложенной ВОЗ, отнесенный к варианту, вызывающему интерес. Данный вариант был обнаружен в марте 2021 г. у супружеской пары. Согласно имеющимся эпидемиологическим данным семья прибыла из Объединенных Арабских Эмиратов (ОАЭ), что позволило отнести данный случай к завозным.

В конце мая 2021 г. доля варианта Альфа начала снижаться, что обусловлено завозом на территорию страны варианта Дельта.

Заключение. Установлена динамика распространения генетических вариантов вируса SARS-CoV-2 в период февраль — май 2021 г. в г. Минске. Показано, что с февраля по май 2021 г. доля варианта Альфа в структуре генетических вариантов, циркулирующих в г. Минске, имела тенденцию к росту с февраля по апрель (11,9, 34,7 и 72,0 % соответственно). Отмечена циркуляция вариантов В.1.1.374 — 21,8 % ($n = 27$), В.1.617.2 — 4,0 % ($n = 5$), В.1.404 — 2,4 % ($n = 3$), и по 0,81 % для каждого из вариантов В.1.1.523 ($n = 1$), В.1.525 ($n = 1$), С.36.3 (В.1.1.1.36.3) ($n = 1$). В конце мая отмечено резкое снижение доли варианта Альфа до 60,3 %, что связано с появлением нового варианта вируса SARS-CoV-2 — Дельта. Предложенные методы молекулярной диагностики позволяют эффективно выявлять варианты, встречающиеся в единичных случаях и относящиеся к завозным.

Список цитированных источников

1. The CoRGI (Coronavirus Russian Genetic Initiative) Consortium Spread of endemic SARS-CoV-2 lineages in Russia before April 2021 / G. V. Klink [et al.] // PLOS ONE. — 2022. — Vol. 17, № 7. — P. 1–21.
2. Structure-based evidence for the enhanced transmissibility of the dominant SARS-CoV-2 B.1.1.7 variant (Alpha) / S. Xia [et al.] // Cell Discovery. — 2021. — Vol. 7, № 1. — P. 109.
3. Effect of SARS-CoV-2 B.1.1.7 mutations on spike protein structure and function / T.-J. Yang [et al.] // Nature Structural & Molecular Biology. — 2021. — Vol. 28, № 9. — P. 731–739.
4. Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Lineage — United States, December 29, 2020 — January 12, 2021 / S. E. Galloway [et al.] // MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report — 2021. — T. 70, № 3. — P. 95–99.
5. SARS-CoV-2 transmission dynamics in Belarus in 2020 revealed by genomic and incidence data analysis / A. Nemira [et al.] // Communications Medicine. — 2021. — Vol. 1, № 1. — P. 31.

Distribution of virus genetic variants SARS-CoV-2 in Minsk in february — may 2021

Bulda K. Yu.¹, Gasich E. L.¹, Kosko A. D.¹, Bunas A. S.¹, Kluyko N. L.²

¹*Republican Scientific and Practical Center of Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus;*

²*City Children's Infectious Clinical Hospital, Minsk, Republic of Belarus*

The alpha variant (Pango classification B.1.1.7) of the SARS-CoV-2 virus was first detected in the southeast of England in September 2020 and by the end of December 2020 had become the dominant variant in the world. It has been classified by WHO experts as a variant of concern that,



due to additional mutations, has biological properties that increase contagiousness, pathogenicity and/or reduce the neutralizing activity of antibodies. Starting from 2020, studies have been carried out in the Republic of Belarus that have made it possible to study the molecular genetic diversity of SARS-CoV-2. The aim of the study was to determine the features of the distribution of the alpha variant (B.1.1.7) of SARS-CoV-2 in 2021 in Minsk. It is shown that the first cases of infection with the alpha variant in Minsk were registered in February 2021, the prevalence of which increased from 11.9 to 72.0 % from February to April. At the end of May, a sharp decrease in the proportion of the Alpha variant to 60.3 % was noted, which is associated with the emergence of a new variant of the SARS-CoV-2 virus — Delta.

Keywords: SARS-CoV-2 virus, alpha variant (B.1.1.7), RT-PCR, sequencing.

Поступила 21.06.2023