

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-156-159

УДК 616.98:578.834.1(470.344)

Н.П. Прищепа, Н.Ю. Добровольская, В.И. Никифорова, Т.С. Тарасова, Е.В. Преображенская

Выявление мутаций гена S SARS-CoV-2 методом ПЦР в сезоны повышенной заболеваемости коронавирусной инфекцией в Чувашской Республике

ФГБУ «Федеральный центр травматологии, ортопедии и эндопротезирования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Чебоксары, Российская Федерация

Мутации в геноме SARS-CoV-2 позволяют эффективно преодолевать многие защитные механизмы организма, чем и объясняется распространение инфекции среди вакцинированных или ранее переболевших людей. **Цель** работы – исследовать динамику мутаций в геноме вируса SARS-CoV-2 в период повышения сезонной заболеваемости в Чувашской Республике. **Материалы и методы.** В условиях клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «Федеральный центр травматологии, ортопедии и эндопротезирования» Минздрава России (г. Чебоксары) методом ОТ-ПЦР исследованы пробы, взятые в январе – феврале и июле – октябре 2022 г., в которых обнаружена РНК SARS-CoV-2. Использовали «МБС-Тест SARS-CoV-2 РНК» (ТУ 21.20.23-068-26329720-2021, Россия) и «АмплиТест SARS-CoV-2 VOC v.3» (серия V017, РУ № РЗН 2022/16307, Россия) в соответствии с инструкциями по применению. **Результаты и обсуждение.** В исследованных пробах, полученных в разные периоды распространения коронавируса SARS-CoV-2 на территории Чувашской Республики в 2022 г., выявлены различия в совокупностях мутаций гена S SARS-CoV-2. В Чувашии, как и в России в целом, в начале 2022 г. вариант дельта был вытеснен вариантом омикрон, продолжающим активно мутировать с появлением множества новых вариантов.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, дельта, омикрон, мутации белкового шипа, обратная транскрипция, ПЦР-амплификация.

Корреспондирующий автор: Прищепа Надежда Петровна, e-mail: fc@orthoscheb.ru.

Для цитирования: Прищепа Н.П., Добровольская Н.Ю., Никифорова В.И., Тарасова Т.С., Преображенская Е.В. Выявление мутаций гена S SARS-CoV-2 методом ПЦР в сезоны повышенной заболеваемости коронавирусной инфекцией в Чувашской Республике. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2023; 4:156–159. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-156-159

Поступила 29.05.2023. Отправлена на доработку 16.06.2023. Принята к публ. 06.07.2023.

N.P. Prishchepa, N.Yu. Dobrovol'skaya, V.I. Nikiforova, T.S. Tarasova, E.V. Preobrazhenskaya

Detection of SARS-CoV-2 S Gene Mutations Using PCR during Seasons of Increased Incidence of Coronavirus Infection in the Chuvash Republic

Federal Center for Traumatology, Orthopedics, and Endoprosthetics of the Ministry of Health of the Russian Federation, Cheboksary, Russian Federation

Abstract. Mutations in the SARS-CoV-2 genome make it possible to effectively escape defense mechanisms of the host, which explains the spread of infection among vaccinated or previously affected by the virus individuals. **The aim** of the study was to investigate the dynamics of mutations in the SARS-CoV-2 virus genome during the rise of the seasonal incidence in the Chuvash Republic. **Materials and methods.** Under conditions of the clinical diagnostic laboratory of the Federal Center for Traumatology, Orthopedics and Endoprosthetics of the Ministry of Health of Russia (Cheboksary), samples, containing SARS-CoV-2 RNA, taken in January-February and July-October, 2022 were tested using reverse transcription PCR. The “MBS-Test SARS-CoV-2 RNA” (Technical Specifications 21.20.23-068-26329720-2021, Russia) and “AmpliTest SARS-CoV-2 VOC v.3” (Series V017, Certificate of Registration No. 2022/16307, Russia) were utilized in compliance with the manufacturer's instructions. **Results and discussion.** Variations in the sets of SARS-CoV-2 S gene mutations have been revealed in the studied samples obtained during different periods of the spread of SARS-CoV-2 coronavirus. Timely detection of various mutations in the virus genome at the beginning of the epidemiological season and the alleged rise in the incidence of coronavirus infection is valuable information for forecasting the rate of virus transmission. It can also be used to create vaccines (taking into account changes in the virus genome) and to choose the adequate tactics for treating coronavirus infection.

Key words: COVID-19, SARS-CoV-2, Delta, Omicron, spike protein mutations, reverse transcription, PCR amplification.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Corresponding author: Nadezhda P. Prishchepa, e-mail: fc@orthoscheb.ru.

Citation: Prishchepa N.P., Dobrovol'skaya N.Yu., Nikiforova V.I., Tarasova T.S., Preobrazhenskaya E.V. Detection of SARS-CoV-2 S Gene Mutations Using PCR during Seasons of Increased Incidence of Coronavirus Infection in the Chuvash Republic. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 4:156–159. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-156-159

Received 29.05.2023. Revised 16.06.2023. Accepted 06.07.2023.

Prishchepa N.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5763-0711>
Dobrovolskaya N.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8786-4316>
Nikiforova V.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4574-943X>

Tarasova T.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0207-6581>
Preobrazhenskaya E.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3556-145X>

В соответствии с Международными медико-санитарными правилами (2005 г.) Комитет по чрезвычайным ситуациям ВОЗ в январе 2020 г. объявил вызванную коронавирусом 2019-nCoV эпидемию «чрезвычайной ситуацией в здравоохранении, имеющей международное значение» [1]. Пандемия COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV-2, привела более чем к 270 млн случаев инфицирования и 5,3 млн смертей во всем мире [2]. ВОЗ предложила выделять варианты SARS-CoV-2, вызывающие обеспокоенность (VOC – variant of concern), и варианты, вызывающие интерес (VOI – variant of interest) [3]. В список VOC вошли альфа (B.1.1.7), бета (B.1.351), гамма (P.1), дельта (B.1.617.2). 28 ноября 2021 г. ВОЗ дополнила этот перечень вариантом омикрон (B.1.1.529). В России в разное время были выявлены все вышеперечисленные варианты SARS-CoV-2.

На данный момент самым распространенным вариантом коронавируса является B.1.1.529, характеризующийся большим количеством мутаций белкового шипа, и его подварианты, основные из которых: BA.1 (B.1.1.529.1) и BA.2 (B.1.1.529.2), BA.3 (B.1.1.529.3), BA.4, BA.5, BA.2.75. Мутации новых подвариантов способствуют ускользанию от иммунитета, что вызывает обеспокоенность в аспекте повторного заражения и прорывной инфекции среди выздоровевшего или вакцинированного населения [4–7]. Появление постоянно развивающихся вариантов предполагает необходимость создания комбинированных антител и вакцинных антигенов [8].

В Российской Федерации лабораторные исследования на COVID-19 проводятся в соответствии с приказом Министерства здравоохранения РФ от 18.05.2021 № 464н «Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований». Для выявления SARS-CoV-2 используется метод амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) (без накопления возбудителя) с применением зарегистрированных в установленном порядке тест-систем в соответствии с инструкциями по их применению. Зарегистрированные тест-системы дают возможность выявлять наличие различных мутаций в геноме вновь появляющихся штаммов SARS-CoV-2, что представляет научный интерес и имеет практическое значение для оценки влияния генных изменений на течение заболевания и модернизацию вакцин против SARS-CoV-2. Существует острая необходимость в вариантном фенотипировании для эпидемиологического надзора за циркулирующими линиями [9].

Цель работы – исследовать динамику мутаций в геноме вируса SARS-CoV-2 в период повышения сезонной заболеваемости в Чувашской Республике.

Материалы и методы

Исследования проводились в условиях клинко-диагностической лаборатории ФГБУ «Федеральный центр травматологии, ортопедии и эндопротезирования» Минздрава России (г. Чебоксары). Материалом исследования послужили 153 положительные пробы биологического материала пациентов – жителей Чувашской Республики, в том числе 89 проб взято в январе – феврале 2022 г., 64 пробы – в июле – октябре 2022 г. Медиана возраста пациентов за январь – февраль – 43,8 года (от 3 до 83 лет), за июль – октябрь – 40,6 года (от 1 до 81 года). Мужчин за январь – февраль – 42,7 %, женщин – 57,3 %, за июль – октябрь – 42,2 и 57,8 % соответственно.

Исследование для выделения РНК SARS-CoV-2 в мазках из носо- и ротоглотки проводилось с помощью набора реагентов для выделения и качественного выявления РНК SARS-CoV-2 методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в реальном времени «МБС-Тест SARS-CoV-2 РНК» (ТУ 21.20.23-068-26329720-2021, Россия). Экстракция РНК производилась комплектом реагентов «АмплиТест Рибо-преп» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России) РУ № РЗН 2020/12985 в соответствии с инструкцией производителя. ОТ-ПЦР выполнялась набором «АмплиТест SARS-CoV-2 VOC v.3» (серия V017, РУ № РЗН 2022/16307, Россия). Набор позволяет проводить качественное выявление РНК коронавируса SARS-CoV-2 – генетических вариантов, вызывающих обеспокоенность (VOC), омикрон и дельта путем выявления характерных для данных вариантов мутаций в гене *S* коронавируса. Принцип тестирования основан на проведении реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК вируса SARS-CoV-2, включающих маркерные мутации в гене *S*. Набор позволяет выявлять в гене *S* SARS-CoV-2 мутации A67V, del69–70, P681H, N679K, сочетание которых характерно для варианта омикрон и его потомков (B.1.1.529, BA.1), мутации P681R и L452R, сочетание которых характерно для варианта дельта SARS-CoV-2 и его потомков (B.1.617.2, AY), а также определять наличие каждой из указанных мутаций в отдельности.

Выявление мутации коронавируса SARS-CoV-2 для одного образца проводилось в двух пробирках. В ходе исследования в режиме реального времени использовался амплификатор Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия).

Результаты и обсуждение

Выявление в клиническом образце нуклеотидной последовательности SARS-CoV-2, содержащей

мутации P681H, N679K, A67V и del69-70, характерные для варианта омикрон, или сочетания мутаций P681R и L452R, характерные для варианта дельта, интерпретируется как выявление генетических маркеров соответствующих вариантов омикрон или дельта SARS-CoV-2. В случае выявления одного из этих сочетаний мутаций рекомендуется провести дальнейшее исследование образца методом автоматического секвенирования кДНК для определения наличия спектра других генетических маркеров, которые в совокупности с указанными мутациями определяют принадлежность к соответствующим генетическим вариантам омикрон или дельта. Ввиду отсутствия технической возможности секвенирование кДНК нами не проводилось.

В исследованных пробах, полученных в различные периоды распространения коронавируса SARS-CoV-2 в 2022 г., отмечаются различия в совокупностях мутаций гена *S* SARS-CoV-2. В период с января по февраль 2022 г. выявлены в 91,01 % случаев мутации гена *S* SARS-CoV-2, характерные для генетического варианта омикрон, в 2,25 % случаев – мутации гена *S* SARS-CoV-2, характерные для генетического варианта дельта, в 6,74 % случаев – характерные для генетического варианта омикрон, но без мутации A67V и делеции 69-70del в гене *S* SARS-CoV-2. В период с июля по октябрь 2022 г. в 100 % случаев выявлены мутации гена *S* SARS-CoV-2, характерные для генетического варианта омикрон, но с присоединением мутации L452R в гене *S* SARS-CoV-2.

По данным исследования аминокислотные замены L452R и P681R в S-белке оказались высококонсервативными для варианта дельта (B.1.617.2) и являются его отличительной чертой [10].

Группа ученых из Японии показала, что концентрация РНК вируса при заражении подвариантом омикрон BA.2 в дыхательных путях выше по сравнению с подвариантом омикрон BA.1, в том числе в легких, и подтвердила потенциальную возможность повторного заражения вариантом BA.2 после перенесенной инфекции, вызванной штаммом BA.1 [10]. Однако предварительные данные от исследовательской группы из Дании (новостное сообщение сайта <https://fmha.gov.ru/> от 18.03.2022) показали, что общее количество госпитализаций при распространении варианта BA.2 не увеличивалось.

К июлю 2022 г. стали доминировать новые подварианты вируса SARS-CoV-2 омикрон – BA.4 и BA.5, имеющие две хорошо известные и встречавшиеся ранее мутации в S-белке: делеция NV69-70 (встречалась в вариантах альфа, бета и омикрон BA.1) и мутация L452R (определялась в варианте дельта). L452R отвечает за ускользание штамма от антител. Ряд исследований показал, что если в омикрон вернуть мутацию L452R, то этот штамм вновь приобретет способность к более высокой инфекционности, что может сделать его более опасным для легких [11].

Постоянный мониторинг геномов SARS-CoV-2 на предмет мутаций критически важен для нашего понимания его эволюции и воздействия на здоровье человека, а также необходим для распознавания изменений вирусных эпитопов, которые потребовали бы модификации вакцины [12, 13]. Поскольку испытания лекарств и вакцин продолжаются, крайне важно принимать во внимание мутации SARS-CoV-2 и их соответствующие частоты, поскольку эти данные могут проложить путь к комбинированию нескольких лекарств [14, 15].

Итак, в исследовании проведена оценка мутаций в РНК SARS-CoV-2 в период повышенной сезонной заболеваемости в Чувашской Республике. Полученные данные отображают динамику распространения вариантов вируса SARS-CoV-2 на территории республики в 2022 г. В Чувашии, как и в России в целом, в начале 2022 г. вариант дельта был вытеснен вариантом омикрон, продолжающим активно мутировать с появлением множества новых вариантов.

Своевременное проведение исследований мутаций в геноме SARS-CoV-2 является ценной информацией для мониторинга скорости распространения инфекции, отслеживания формирования географических штаммов SARS-CoV-2, что позволяет устанавливать источники заносов из-за рубежа, определять свойства вируса и корректировать тест-системы для диагностики в случае необходимости.

На основании вышесказанного считаем целесообразным более широкое проведение исследований мутаций в геноме SARS-CoV-2 аккредитованными лабораториями медицинских организаций.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

References / Список литературы

1. Statement on the second meeting of the International Health Regulations (2005) Emergency Committee regarding the outbreak of novel coronavirus (2019-nCoV). 30 January 2020. WHO. (Cited 31 May 2023). [Internet]. Available from: [https://www.who.int/news-room/detail/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/news-room/detail/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-(2019-ncov)).
2. Lupala C.S., Ye Y., Chen H., Su X.D., Liu H. Mutations on RBD of SARS-CoV-2 Omicron variant result in stronger binding to human ACE2 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2022; 590:34–41. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.12.079.
3. Hirabara S.M., Serdan T.D.A., Gorjao R., Masi L.N., Pithon-Curi T.C., Covas D.T., Curi R., Durigon E.L. SARS-CoV-2 variants: differences and potential of immune evasion. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2022; 11:781429. DOI: 10.3389/fcimb.2021.781429.
4. Motozono C., Toyoda M., Zahradnik J., Saito A., Nasser H., Tan T.S., Ngare I., Kimura I., Uriu K., Kosugi Y., Yue Y., Shimizu R., Ito J., Torii S., Yonekawa A., Shimono N., Nagasaki Y., Minami R., Toya T., Sekiya N., Fukuhara T., Matsuura Y., Schreiber G.; Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium; Ikeda T., Nakagawa S., Ueno T., Sato K. SARS-CoV-2 spike L452R variant evades cellular immunity and increases infectivity. *Cell Host Microbe.* 2021; 29(7):1124–1136.e11. DOI: 10.1016/j.chom.2021.06.006.
5. Wang Q., Guo Y., Iketani S., Nair M.S., Li Z., Mohri H., Wang M., Yu J., Bowen A.D., Chang J.Y., Shah J.G., Nguyen N., Chen Z., Meyers K., Yin M.T., Sobieszczyk M.E., Sheng Z., Huang Y.,

- Liu L., Ho D.D. Antibody evasion by SARS-CoV-2 Omicron sub-variants BA.2.12.1, BA.4 and BA.5. *Nature*. 2022; 608(7923):603–8. DOI: 10.1038/s41586-022-05053-w.
6. Zhao X., Zhang R., Qiao S., Wang X., Zhang W., Ruan W., Dai L., Han P., Gao G.F. Omicron SARS-CoV-2 neutralization from inactivated and ZF2001 vaccines. *N. Engl. J. Med.* 2022; 387(3):277–80. DOI: 10.1056/NEJMc2206900.
7. Deng X., Garcia-Knight M.A., Khalid M.M., Servellita V., Wang C., Morris M.K., Sofomayor-González A., Glasner D.R., Reyes K.R., Gliwa A.S., Reddy N.P., Sanchez San Martin C., Federman S., Cheng J., Balcerak J., Taylor J., Streithorst J.A., Miller S., Sreekumar B., Chen P.Y., Schulze-Gahmen U., Taha T.Y., Hayashi J.M., Simoneau C.R., Kumar G.R., McMahon S., Lidsky P.V., Xiao Y., Hemarajata P., Green N.M., Espinosa A., Kath C., Haw M., Bell J., Hacker J.K., Hanson C., Wadford D.A., Anaya C., Ferguson D., Frankino P.A., Shivram H., Lareau L.F., Wyman S.K., Ott M., Andino R., Chiu C.Y. Transmission, infectivity, and neutralization of a spike L452R SARS-CoV-2 variant. *Cell*. 2021; 184(13):3426–3437.e8. DOI: 10.1016/j.cell.2021.04.025.
8. Ou J., Wu J., Zhang Q. Structural insights into the Omicron spike trimer: tackling the challenges of continuously evolving SARS-CoV-2 variants. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2022; 7(1):322. DOI: 10.1038/s41392-022-01179-5.
9. Chung H.Y., Jian M.J., Chang C.K., Lin J.C., Yeh K.M., Chen C.W., Hsieh S.S., Hung K.S., Tang S.H., Perng C.L., Chang F.Y., Wang C.H., Shang H.S. Emergency SARS-CoV-2 variants of concern: novel multiplex real-time RT-PCR assay for rapid detection and surveillance. *Microbiol. Spectr.* 2022; 10(1):e0251321. DOI: 10.1128/spectrum.02513-21.
10. Saito A., Irie T., Suzuki R., Maemura T., Nasser H., Uriu K., Kosugi Y., Shirakawa K., Sadamasu K., Kimura I., Ito J., Wu J., Iwatsuki-Horimoto K., Ito M., Yamayoshi S., Loeber S., Tsuda M., Wang L., Ozono S., Butlertanaka E.P., Tanaka Y.L., Shimizu R., Shimizu K., Yoshimatsu K., Kawabata R., Sakaguchi T., Tokunaga K., Yoshida I., Asakura H., Nagashima M., Kazuma Y., Nomura R., Horisawa Y., Yoshimura K., Takaori-Kondo A., Imai M.; Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium; Tanaka S., Nakagawa S., Ikeda T., Fukuhara T., Kawaoka Y., Sato K. Enhanced fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Delta P681R mutation. *Nature*. 2022; 602(7896):300–6. DOI: 10.1038/s41586-021-04266-9.
11. Ou J., Lan W., Wu X., Zhao T., Duan B., Yang P., Ren Y., Quan L., Zhao W., Seto D., Chodosh J., Luo Z., Wu J., Zhang Q. Tracking SARS-CoV-2 Omicron diverse spike gene mutations identifies multiple inter-variant recombination events. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2022; 7(1):138. DOI: 10.1038/s41392-022-00992-2.
12. Zhang Y., Zhang T., Fang Y., Liu J., Ye Q., Ding L. SARS-CoV-2 spike L452R mutation increases Omicron variant fusogenicity and infectivity as well as host glycolysis. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2022; 7(1):76. DOI: 10.1038/s41392-022-00941-z.
13. Boehm E., Kronig I., Neher R.A., Eckerle I., Vetter P., Kaiser L.; Geneva Centre for Emerging Viral Diseases. Novel SARS-CoV-2 variants: the pandemics within the pandemic. *Clin. Microbiol. Infect.* 2021; 27(8):1109–17. DOI: 10.1016/j.cmi.2021.05.022.
14. Badua C.L.D.C., Baldo K.A.T., Medina P.M.B. Genomic and proteomic mutation landscapes of SARS-CoV-2. *J. Med. Virol.* 2021; 93(3):1702–21. DOI: 10.1002/jmv.26548.
15. Cosar B., Karagulleoglu Z.Y., Unal S., Ince A.T., Uncuoglu D.B., Tuncer G., Kilinc B.R., Ozkan Y.E., Ozkoc H.C., Demir I.N., Eker A., Karagoz F., Simsek S.Y., Yasar B., Pala M., Demir A., Atak I.N., Mendi A.H., Bengi V.U., Cengiz Seval G., Gunes Altuntas E., Kilic P., Demir-Dora D. SARS-CoV-2 mutations and their viral variants. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2022; 63:10–22. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2021.06.001.

Authors:

Prishchepa N.P., Dobrovol'skaya N.Yu., Nikiforova V.I., Tarasova T.S., Preobrazhenskaya E.V. Federal Center for Traumatology, Orthopedics, and Endoprosthetics. 33, Fedora Gladkova St., Cheboksary, 428020, Russian Federation. E-mail: fc@orthoscheb.ru.

Об авторах:

Прищепа Н.П., Добровольская Н.Ю., Никифорова В.И., Тарасова Т.С., Преображенская Е.В. Федеральный центр травматологии, ортопедии и эндопротезирования. Российская Федерация, 428020, Чебоксары, ул. Федора Гладкова, 33. E-mail: fc@orthoscheb.ru.