

РАЗРАБОТКА ПЦР-ТЕСТА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ АЛЬФА, БЕТА, ГАММА, ДЕЛЬТА ВИРУСА SARS-COV-2

Г. А. Шипулин, Ю. А. Савочкина, А. К. Шуряева , Е. Е. Шивлягина, А. О. Носова, Е. Е. Давыдова, А. Р. Лупарев, Т. В. Малова, С. М. Юдин

Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровья Федерального медико-биологического агентства, г. Москва, Россия

Возникновение новых вариантов коронавируса SARS-CoV-2, обладающих повышенной трансмиссивностью и снижающих эффективность его нейтрализации выработанными ранее антителами, представляет угрозу для здоровья населения во всем мире. Метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с флуоресцентными зондами, позволяющими детектировать единичные нуклеотидные замены, подходит для скрининга содержащих РНК SARS-CoV-2 образцов на наличие уже известных мутаций в S-гене, которые имеют функциональное значение, и выявление которых позволяет определять и дифференцировать геноварианты, имеющие наибольшее эпидемиологическое значение. Целью настоящей работы было разработать набор реагентов и методику для оперативного мониторинга распространения приоритетно значимых вариантов SARS-CoV-2. На основе выравнивания полногеномных последовательностей SARS-CoV-2, опубликованных в базе данных GISAID, были выбраны праймеры и LNA-модифицированные зонды для выявления мутаций в S-гене, характерных для генетических линий альфа, бета/гамма и дельта особой эпидемиологической значимости (VOC). Разработан и зарегистрирован набор реагентов в формате ОТ-ПЦР в реальном времени для выявления наиболее значимых мутаций в S-гене SARS-CoV-2, продемонстрированы его высокие аналитические и диагностические характеристики. Показано соответствие результатов выявления линий VOC и их основных мутаций разработанным набором с данными полногеномного секвенирования для 1500 образцов РНК SARS-CoV-2. Применение набора реагентов в сочетании с последующим секвенированием РНК SARS-CoV-2 в рамках проведения эпидемиологического мониторинга позволило оперативно установить факт появления на территории России геноварианта дельта и в дальнейшем отследить динамику изменения его распространенности в Московском регионе в период с апреля по сентябрь 2021 г.

Ключевые слова: коронавирус, COVID-19, SARS-CoV-2, N501Y, P681H, 69-70del, E484K, B.1.1.7, B.1.351, P.1, изоляты особой эпидемиологической значимости

Вклад авторов: Г. А. Шипулин, Ю. А. Савочкина, Е. Е. Давыдова, С. М. Юдин — планирование эксперимента; Г. А. Шипулин, Ю. А. Савочкина, С. М. Юдин — анализ литературы; А. К. Шуряева, Е. Е. Шивлягина, А. О. Носова, А. Р. Лупарев, Т. В. Малова — постановка эксперимента и интерпретация результатов; Ю. А. Савочкина, Е. Е. Шивлягина, А. О. Носова — разработка набора реагентов; А. Р. Лупарев — статистический анализ; Г. А. Шипулин, А. К. Шуряева — написание и редактирование рукописи; Е. Е. Давыдова, С. М. Юдин — редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации и ГОСТ Р ИСО 14155-2014.

 **Для корреспонденции:** Анна Константиновна Шуряева
ул. Погодинская, д. 10, стр. 1, 119121, г. Москва; ashuryaeva@cspmrz.ru

Статья получена: 15.12.2021 **Статья принята к печати:** 13.01.2022 **Опубликована онлайн:** 09.02.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.003

DEVELOPMENT OF PCR TEST FOR DETECTION OF THE SARS-COV-2 GENETIC VARIANTS ALPHA, BETA, GAMMA, DELTA

Shipulin GA, Savochkina YuA, Shuryaeva AK , Shivlyagina EE, Nosova AO, Davydova EE, Luparev AR, Malova TV, Yudin SM

Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

The emergence of novel SARS-CoV-2 genetic variants with increased transmissivity and reduced antibody neutralization efficiency is a threat to global public health. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with the use of fluorescent probes, which make it possible to detect the single nucleotide substitutions, is a technique suitable for screening the SARS-CoV-2 RNA-containing samples for the already known functionally significant mutations in the S-gene, identification of which allows to define and differentiate the most epidemiologically significant genetic variants. The study was aimed to develop an assay for the large-scale monitoring of the spread of the SARS-CoV-2 top-priority variants. Based on the whole-genome alignment of the SARS-CoV-2 sequences, deposited in the GISAID database, primers and LNA-modified probes were selected to detect mutations in the S gene, typical for the Alpha, Beta/Gamma and Delta variants of concern (VOC). The developed reagent kit for detection of the key mutations in the SARS-CoV-2 S gene by the real time RT-PCR has good analytical and diagnostic characteristics and was authorized as a medical device (reagent) for *in vitro* use. The results of detecting the VOC and the key mutations with the use of the developed reagent kit were consistent with the data of the whole genome sequencing of 1,500 SARS-CoV-2 RNA samples. The developed reagent kit and the subsequent SARS-CoV-2 RNA sequencing assay used to perform the epidemiological monitoring of SARS-CoV-2 variants made it possible to promptly report the emergence of the Delta genetic variant in Russia, and to trace the dynamic changes in the prevalence of Delta in Moscow Region in April–September 2021.

Keywords: coronavirus, COVID-19, SARS-CoV-2, N501Y, P681H, 69-70del, E484K, B.1.1.7, B.1.351, P.1, VOC

Author contribution: Shipulin GA, Savochkina YuA, Davydova EE, Yudin SM — planning the experiment; Shipulin GA, Savochkina YuA, Yudin SM — literature analysis; Shuryaeva AK, Shivlyagina EE, Nosova AO, Luparev AR, Malova TV — experimental procedure, data interpretation; Savochkina YuA, Shivlyagina EE, Nosova AO — reagent kit development; Luparev AR — statistical analysis; Shipulin GA, Shuryaeva AK — manuscript writing and editing; Davydova EE, Yudin SM — manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was performed in accordance with the requirements of the Declaration of Helsinki and GOST R ISO 14155-2014.

 **Correspondence should be addressed:** Anna K. Shuryaeva
Pogodinskaya, 10, str. 1, 119121, Moscow; ashuryaeva@cspmrz.ru

Received: 15.12.2021 **Accepted:** 13.01.2022 **Published online:** 09.02.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.003

В конце 2019 г. в Китае был выявлен новый коронавирус, вызывающий опасное респираторное заболевание человека — COVID-19. После секвенирования генома вирус был отнесен к бетакоронавирусам и назван SARS-CoV-2 [1–3]. Высокая способность коронавирусов к приобретению новых мутаций хорошо известна [4]. Большинство возникающих мутаций не влияют на свойства вируса, однако некоторые из них могут приводить к функциональным изменениям, в том числе к увеличению скорости распространения вируса и/или тяжести течения заболевания.

С момента начала распространения нового коронавируса в базе данных GISAID опубликовано большое количество последовательностей геномов [5], что позволило следить как за распространением вируса, так и за возникновением новых мутаций в его геноме.

В декабре 2020 г. власти Великобритании заявили о возросшем числе случаев заражения COVID-19. Резкий рост заболеваемости был вызван новым генетическим вариантом коронавируса SARS-CoV-2, имевшим отличия от референсного генома. Он содержал мутации в гене S-белка [6, 7]. На основании филогенетического анализа вновь появившаяся британская линия SARS-CoV-2 была названа B.1.1.7, ее отнесли к вариантам особой эпидемиологической значимости (VOC). Вариант B.1.1.7 имеет ряд характерных мутаций в спайковом белке, в том числе N501Y, A570D, D614G и P681H, а также делеции аминокислот 69–70 и 144Y [8, 9]. Одновременно была выявлена еще одна эпидемиологически важная линия, вызвавшая вспышку в различных провинциях Южноафриканской республики, которая известна как B.1.351. Южноафриканский штамм содержит девять спайковых мутаций в дополнение к D614G, в том числе кластер мутаций (например, 242–244del и R246I) в N-концевом домене (NTD) шипа, три мутации (K417N, E484K и N501Y) в рецептор-связывающем домене (RBD) и одну мутацию (A701V) рядом с сайтом расщепления фурина [10, 11]. В январе 2021 г. специалисты Национального института инфекционных болезней в Японии обнаружили новый вариант SARS-CoV-2, изоляты которого были выявлены у прибывших из Бразилии туристов — линию P.1. Некоторые мутации бразильского штамма были найдены ранее в британском и южноафриканском вариантах. Данный изолят имеет 12 мутаций в спайковом белке, в том числе N501Y и E484K [12]. Позднее описанные выше генетические линии коронавируса назвали буквами греческого алфавита в соответствии с предложенной ВОЗ номенклатурой — альфа (B.1.1.7 и ее субварианты Q.1–Q.8), бета (B.1.351), гамма (P.1). Все три указанных генетических варианта SARS-CoV-2 включены Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) и Европейским центром контроля и профилактики заболеваний (ECDC) в категорию особой эпидемиологической значимости (VOC) и циркулируют по всему миру [6].

Весной 2021 г. в Индии выявили новую линию SARS-CoV-2 — B.1.617.2, которая стремительно распространялась и вызвала новую волну пандемии с резким ростом заболеваемости и числа летальных исходов сначала в Индии, а затем и в других странах в различных регионах мира. Линия B.1.617.2, как и ряд выявленных позднее близких генетических линий AY.1, AY.2–124, содержит следующие характерные мутации в белке S: T19R, E156G, del157/158, L452R, T478K, D614G, P681R и D950N, включая мутации внутри рецептор-связывающего домена [13]. Линия B.1.617.2, как и линии AY.1–124,

отнесены к категории наибольшего эпидемиологического значения, в соответствии с классификацией ВОЗ им дано наименование дельта.

По данным ряда публикаций, мутация N501Y в гене S, которая присутствует в геномах трех из четырех описанных выше линий VOC, влияет на аффинность связывания S-белка с ACE2-рецептором, что может приводить к повышению трансмиссивности [14–16]. Наличие мутации E484K может быть причиной ускользания вируса от моноклональных антител, возникших после ранее перенесенного заболевания, вызванного SARS-CoV-2 вариантами без этой мутации, или после вакцинации [17–19].

Опубликованы данные об увеличении средней продолжительности инфекции, вызванной штаммами, относящимися к линии альфа, по сравнению с аналогичным показателем для не относящихся к этой линии штаммов (13,3 дня против 8,2 дня соответственно) [20]. На сегодняшний момент нет данных, подтверждающих способность генетического варианта SARS-CoV-2 альфа ускользать от моноклональных антител, выработанных после вакцинации [8, 21–23]. При этом, согласно литературным данным, южноафриканский и бразильский варианты могут снижать эффективность некоторых вакцин против COVID-19 [7, 24]. Структурный анализ мутации RBD L452R вместе с расположенной в сайте расщепления фурина мутацией P681R показал, что эти мутации могут способствовать увеличению эффективности связывания с рецептором ACE2 и скорости расщепления S1–S2, обеспечивая увеличение трансмиссивности вируса. Наличие этой мутации в RBD-доме указывает на снижение связывания с выработанными моноклональными антителами и может влиять на их потенциал нейтрализации [13, 25].

Исходя из всего вышесказанного, выявление различных линий коронавируса и отслеживание распространения изолятов SARS-CoV-2, относящихся к линиям особой эпидемиологической значимости, является важной задачей.

В настоящее время секвенирование генома вируса представляет собой самый доступный метод, позволяющий обнаруживать новые быстро возникающие варианты SARS-CoV-2. Однако исследования методом геномного секвенирования являются дорогостоящими и занимают длительное время. Кроме того, в отличие от ПЦР метод имеет дополнительное ограничение по минимальной необходимой концентрации РНК вируса в образце. Метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) подходит для скрининга содержащих РНК SARS-CoV-2 образцов на наличие уже известных имеющих функциональное значение мутаций в S-гене коронавируса. Выявление таких мутаций позволяет определять и дифференцировать включенные в категорию VOC варианты вируса, которые имеют наибольшее эпидемиологическое значение. Использование олигонуклеотидных зондов с модифицированными LNA-нуклеотидами позволяет успешно выявлять даже однонуклеотидные замены в анализируемой последовательности гена [26]. Применение ОТ-ПЦР рекомендовано для увеличения объемов и производительности при скрининге приоритетно значимых генетических вариантов вируса руководством по выявлению и идентификации генетических вариантов SARS-CoV-2, подготовленном экспертами ВОЗ и ECDC [27]. Существуют зарубежные наборы реагентов для выявления важных мутаций в гене S-белка методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Например, набор реагентов корейского производителя PowerChek выявляет мутации,

Таблица. Каналы для флуорофоров и детектируемые мишени для каждой смеси

Канал для флуорофора / ОТ-ПЦР-смесь	Детектируемая РНК-мишень		
	FAM	JOE	ROX
2-A	мутация N501Y в гене S SARS-CoV-2	участок кодона 501 гена S SARS-CoV-2 без мутации N501Y	делеция 69-70del в гене S SARS-CoV-2
2-B	участок кодона 484 гена S SARS-CoV-2 без мутации E484K	мутация E484K в гене S SARS-CoV-2	мутация E484Q в гене S SARS-CoV-2
2-C	мутации P681H/R в гене S SARS-CoV-2	мутация L452R в гене S SARS-CoV-2	мутация P681R в гене S SARS-CoV-2

характерные для линий дельта, альфа, бета и гамма, а набор французского производителя ID детектирует мутации L452R, E484K и E484Q. В России зарегистрированы наборы реагентов для выявления мутаций, характерных только для линии альфа (выпущены ЦНИИЭ Роспотребнадзора и компанией «ДНК-Технология»), другие линии не охвачены.

Таким образом, разработка отечественного набора реагентов для оперативного мониторинга распространения приоритетно значимых вариантов SARS-CoV-2 чрезвычайно актуальна. В связи с этим разработаны методика и набор реагентов на основе ОТ-ПЦР для детекции спектра мутаций в S-гене коронавируса, характерных для четырех генетических вариантов особого эпидемиологического значения, и выявления РНК SARS-CoV-2 вариантов дельта, альфа и бета/гамма (без дифференцировки двух последних) путем выявления соответствующего сочетания основных мутаций. Целью настоящей работы было разработать набор, позволяющий выявлять мутации N501Y, P681H и делецию 69-70del, сочетание которых характерно для генетической линии альфа, мутацию E484K, которая в сочетании с мутацией N501Y характерна для генетических линий бета и гамма SARS-CoV-2, мутации P681R и L452R, сочетание которых характерно для генетической линии дельта, а также определять наличие каждой из указанных мутаций в отдельности. Разработанный набор может служить инструментом мониторинга, обеспечивая оперативное получение данных по динамике распространения штаммов (или генетических вариантов) коронавируса SARS-CoV-2 приоритетного эпидемиологического значения, обладающих функционально значимыми мутациями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн олигонуклеотидов для амплификации целевых участков S гена

Для выбора диагностических праймеров и зондов, детектирующих мутации, характерные для генетических линий коронавируса SARS-CoV-2 особой эпидемиологической значимости, использовали выравнивание полногеномных последовательностей коронавируса SARS-CoV-2, опубликованных в базе данных GISAID (дата обращения: 05.10.2021). На основе выравнивания определены участки с соответствующими мутациями в области S-гена вируса, подобраны праймеры и LNA-модифицированные зонды для выявления следующих мутаций в геноме коронавируса SARS-CoV-2: N501Y, делеции 69-70del, P681H и P681R, L452R, E484K, E484Q. Олигонуклеотиды подбирали в соответствии со стандартными требованиями к выбору праймеров и TaqMan-зондов [28, 29], используя онлайн-ресурсы Oligo Calc [30] и OligoAnalyzer Tool [31]. Термодинамические характеристики флуоресцентных зондов и их вторичную

структуру оценивали с помощью онлайн-сервиса Mfold Web Server [32]. Синтез олигонуклеотидов выполнен специалистами компании АО «Гентерра» (Россия).

Клинические образцы

Мазки из ротоглотки и носоглотки ($n = 10\ 297$) получены ФГБУЗ «Головной центр гигиены и эпидемиологии Федерального медико-биологического агентства» (г. Москва) в период с декабря 2020 г. по сентябрь 2021 г. от пациентов с симптомами ОРВИ. Образцы мазков собирали в пробирки с транспортной средой («ЦНИИЭ Роспотребнадзора»; Россия) и хранили при температуре $-70\ ^\circ\text{C}$ до испытания.

Экстракция РНК

Экстракцию РНК проводили с помощью набора «АмплиТест РИБО-преп» («ЦСП ФМБА»; Россия) в соответствии с инструкцией производителя. РНК элюировали в 50 мкл РНК-буфера. Образцы РНК хранили при температуре не выше $-70\ ^\circ\text{C}$ до использования.

ОТ-ПЦР

ОТ-ПЦР проводили в мультиплексном формате в соответствии с инструкцией. Помимо образцов РНК каждая постановка включала в себя положительные контрольные образцы (ПКО) A, B, C, ПКО W на дикий тип, а также отрицательный контроль постановки.

Анализ каждого образца на наличие мутаций, характерных для генетических линий особого эпидемиологического значения (VOC) альфа, дельта и бета/гамма, проводили в трех пробирках — на смесях 2-A, 2-B и 2-C. Анализировали кривые накопления флуоресцентного сигнала по трем различным каналам (табл.). Объем исследуемой РНК — 10 мкл.

Программа амплификации включала следующие стадии термоциклирования: $50\ ^\circ\text{C}$ — 15 мин, $95\ ^\circ\text{C}$ — 15 мин. Перечисленные ниже стадии повторяли 45 циклов: $95\ ^\circ\text{C}$ — 15 с, $60\ ^\circ\text{C}$ — 30 с, $72\ ^\circ\text{C}$ — 15 с.

Оптимизация набора реагентов «АмплиТест SARS-CoV-2 VOC v.2» выполнена на амплификаторах Rotor-Gene Q (Qiagen; Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories; США) и ДТпрайм («ДНК-Технология»; Россия).

Разработка ПКО

В качестве ПКО использовали смесь рекомбинантных плазмид, содержащих амплифицированные целевые фрагменты S-гена, которые являются мишенями для выбранных праймеров и зондов.

ПЦР-продукты очищали с помощью набора MiniElute Gel Extraction Kit (Qiagen; Германия), лигировали

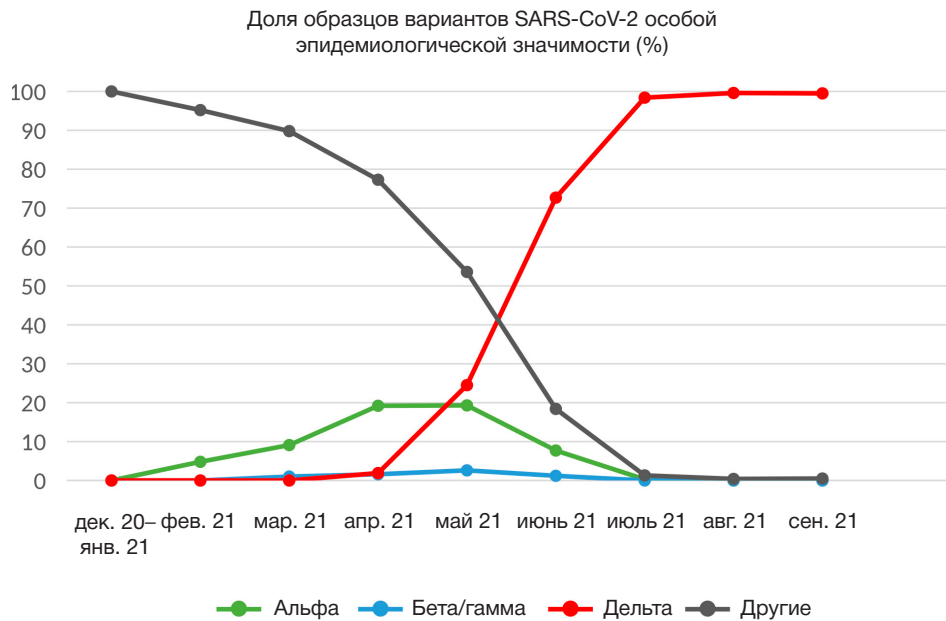


Рис. 1. Результаты тестирования образцов РНК SARS-CoV-2 ($n = 10\,297$), собранных на территории г. Москвы и Московской области в рамках мониторинга распространения линий особой эпидемиологической значимости с декабря 2020 г. по сентябрь 2021 г.

в плазмидный вектор pGEM-T (Promega; США) и трансформировали в *Escherichia coli*. Рекombинантные плазмиды из индивидуальных клонов очищали с помощью набора Plasmid Miniprep Kit (Axxygen; США). Нуклеотидные последовательности ПКО подтверждали с помощью секвенирования по Сэнгеру методом «cycle sequence» с использованием набора ABI PRISM Big Dye v.3.1 (Thermo Fisher Scientific; США) согласно инструкции изготовителя, используя капиллярный автоматический генетический анализатор Applied Biosystems Sanger Sequencing 3500 (Thermo Fisher Scientific; США). Для секвенирования использовали прямой и обратный праймеры, фланкирующие ПЦР-фрагмент.

Реакцию секвенирования проводили в объеме 5 мкл реакционной смеси в тонкостенных микропробирках объемом 0,2 мл. Реакционная смесь содержала 0,8 мкл специфичного праймера (прямого или обратного) в концентрации 1 мкМ и 1 мкл готовой смеси Ready Reaction BigDye Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific; США). Компоненты смеси аккуратно смешивали и проводили термоциклирование на амплификаторе SimpliAmp VeriFlex 96 (Thermo Fisher Scientific; США) по следующей программе: начальная денатурация — 2 мин при 95 °C, затем 45 циклов (денатурация 95 °C — 20 с, отжиг праймера 60 °C — 30 с, элонгация 68 °C — 1 мин). Капиллярный электрофорез проводили на генетическом анализаторе Applied Biosystems Sanger Sequencing 3500 (Thermo Fisher Scientific; США) после очистки образцов от избытка дидезоксинуклеотидов и солей.

Для набора реагентов разработали четыре ПКО: ПКО А, содержащий участок кодона 501 гена S SARS-CoV-2 с мутацией N501Y и участок гена S с делецией 69-70del; ПКО В, содержащий смесь рекombинантных плазмид с участками кодона 484 гена S SARS-CoV-2 с мутациями E484K и E484Q; ПКО С, содержащий плазмиды с мутациями P681H, L452R и P681R в гене S SARS-CoV-2; ПКО W, содержащий плазмиды с участками кодонов 484 и 501 гена S SARS-CoV-2 без мутаций N501Y и E484K.

Концентрацию каждого из ПКО измеряли методом цифровой капельной ПЦР (ddPCR) с использованием системы QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad

Laboratories; США). ПКО вводили на этапе постановки ОТ-ПЦР как отдельные образцы.

Аналитическая чувствительность и специфичность

Для оценки аналитической чувствительности использовали образцы РНК вируса SARS-CoV-2, полученные путем экстракции из биологического материала (мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки), которые исследовали с помощью разработанной диагностической системы для выявления минимального порогового разведения, при котором образец детектируется как положительный. Предварительно концентрацию каждого из образцов измеряли методом цифровой капельной ПЦР (ddPCR) с использованием системы QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad Laboratories; США). Порог чувствительности устанавливали по минимальному разведению, детектированному в трех повторях.

Для оценки аналитической специфичности набора реагентов использовали РНК штамма вируса SARS-CoV-2 № ГК2020/1 из коллекции НИЦЭМ имени Н. Ф. Гамалеи, РНК штаммов коронавирусов HCoV 229E, HCoV OC43, HCoV NI63, SARS-CoV HKU39849, MERS-CoV (European Virus ArchiveGlobal 011N-03868 — Coronavirus RNA specificity panel), штаммов вируса гриппа А (H1N1) (ATCC VR-1469), вируса гриппа А (H3N2) (ATCC VR-776) и вируса гриппа В (Victoria Lineage) (ATCC VR-1930) из коллекции ATCC (American Type Culture Collection; США), штаммов *Streptococcus pneumoniae* (№ 131116), *Streptococcus pyogenes* (№ 130001), *Haemophilus influenzae* (№ 151221), *Staphylococcus aureus* (№ 201108), *Klebsiella pneumoniae* из коллекции патогенных микроорганизмов (ГКПМ) НЦЭСМП Минздрава России, штаммов вируса парагриппа человека типов 1, 2, 3, риновируса человека типов 13, 17, 26 из Государственной коллекции НИИ гриппа имени А. А. Смородинцева в концентрации не менее 1×10^6 ГЭ/мл.

Полногеномное секвенирование образцов (WGS)

Референс-методом выявления мутаций в образцах РНК было полногеномное секвенирование (WGS).

В секвенирование взяли образцы с пороговым циклом (Ct) при постановке ОТ-ПЦР не более 25. Проведена обратная транскрипция образцов РНК с использованием набора реагентов «Реверта-Л» («ЦСП ФМБА»; Россия). Полученную кДНК амплифицировали с помощью панели олигонуклеотидов AmpliSeq for Illumina SARS-CoV-2 Research Panel (Illumina; США), которая содержит 247 ампликонов в двух пулах, полностью покрывающих геном вируса SARS-CoV-2. Подготовку библиотек для высокопроизводительного секвенирования выполняли с помощью набора реагентов AmpliSeq Library PLUS kit (Illumina; США). Качество библиотек оценивали методом капиллярного электрофореза с использованием системы Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent; США). Концентрацию библиотеки измеряли с помощью флуориметра Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific; США) с применением набора реактивов HS Qubit dsDNA (Thermo Fisher Scientific; США). Для секвенирования использовали систему Illumina NextSeq 550 и набор реагентов NextSeq 500/550 v2.5 (300 циклов) (Illumina; США). Все процедуры выполняли в соответствии с рекомендациями производителей.

Статистический анализ

Диагностическую чувствительность (долю положительных результатов теста в группе положительных образцов) рассчитывали как $B/(A+B) \times 100\%$, а диагностическую специфичность (долю отрицательных результатов теста в группе отрицательных образцов) — как $B/(A+B) \times 100\%$, где B — число исследованных проб, для которых с помощью набора получен положительный результат из общего числа проб, A — число исследованных проб, для которых с помощью набора получен отрицательный результат из общего числа проб с истинно положительным результатом. Доверительные интервалы диагностических характеристик рассчитывали по методу Клоппера–Пирсона, доверительную вероятность считали равной 95%.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При разработке набора реагентов в качестве мишеней были выбраны участки S-гена SARS-CoV-2, фланкирующие мутации, характерные для генетических линий SARS-CoV-2 альфа, бета/гамма и дельта. Подобраны праймеры и зонды для выявления мутаций N501Y, P681H и делеции 69-70del, сочетание которых характерно для генетической линии SARS-CoV-2 альфа (B.1.1.7), мутаций P681R и L452R, сочетание которых характерно для генетических линий дельта (B.1.617.2 и все варианты AY), мутации E484K, которая в сочетании с N501Y характерна для генетических линий бета и гамма (B.1.351/P.1, без дифференцировки этих линий).

Набор разработан в формате использования трех ОТ-ПЦР-смесей для проведения анализа, каждая из которых обеспечивает детекцию трех маркеров, регистрируемых по трем различным флуоресцентным каналам. Помимо основных мутаций в гене S спектр определяемых набором генетических маркеров дополнительно включает два кодона E484 и N501, соответствующие референсной последовательности РНК SARS-CoV-2. Они выступают в качестве эндогенного контроля для исключения ложноотрицательного результата.

Для определения аналитической специфичности проведено тестирование образцов других перечисленных выше вирусов и бактерий, ложных положительных результатов выявлено не было. При исследовании РНК

штамма вируса SARS-CoV-2 № ГК2020/1 из коллекции НИЦЭМ имени Н. Ф. Гамалеи с помощью набора не обнаружены мутации в кодонах 501, 484, 681 и 69-70 гена S SARS-CoV-2, результат соответствовал полногеномной нуклеотидной последовательности данного изолята, выложенной в базу данных GISAID (EPI_ISL_421275). Для всех образцов, не содержащих РНК SARS-CoV-2, получен следующий результат: недостаточно РНК SARS-CoV-2 для анализа.

Для определения аналитической чувствительности использовали образцы биологического материала с известной концентрацией РНК вируса SARS-CoV-2, определенной методом цифровой капельной ПЦР. Определяемые генетические варианты воспроизводимо выявляли до концентрации РНК SARS-CoV-2 1×10^3 копий/мл, что определило аналитическую чувствительность набора реагентов.

Диагностические характеристики разработанного набора реагентов оценены в ходе регистрационных клинических испытаний при исследовании образцов РНК SARS-CoV-2, охарактеризованных методом полногеномного секвенирования или секвенирования S-гена по Сенгеру. Для оценки диагностической чувствительности проанализированы 192 образца мазков из носа- и ротоглотки, в том числе 32 образца, содержащие РНК SARS-CoV-2 с комбинацией мутаций в S-гене, характерной для генетической линии альфа (B.1.1.7), 28 образцов, содержащих РНК SARS-CoV-2 с комбинацией мутаций, характерной для генетических линий бета/гамма (B.1.351/P.1), 50 образцов, содержащих РНК SARS-CoV-2 линии дельта (B.1.617.2 и все варианты AY). Для оценки диагностической специфичности использовали 82 образца РНК из мазков из носа- и ротоглотки, содержащих РНК SARS-CoV-2 без анализируемых мутаций. Во всех образцах выявлены все целевые мутации и их комбинации, соответствующие линиям дельта, альфа или бета/гамма. Дискордантные (неспецифичные) результаты не зафиксированы. Таким образом, определен показатель диагностической чувствительности (ДЧ), соответствующий 100% (ДЧ с 95%-й доверительной вероятностью составила 94,2–100% для линии дельта, 91,1–100% для линии альфа, 89,9–100% для линий бета/гамма). Показатель диагностической специфичности составил 100% (с 95%-й доверительной вероятностью — 96,4–100%).

В дальнейшем при практическом применении набора реагентов было показано полное соответствие результатов выявления линий VOC и их основных мутаций в сравнении с результатами полногеномного секвенирования для 1500 образцов, представляющих собой образцы РНК вируса линий альфа, бета, гамма и других линий (получены с марта по май 2021 г.) и дельта (получены с июня по август 2021 г.). Все проанализированные образцы имели соответствующие комбинации мутаций в S-гене, по которым были определены следующие генетические линии SARS-CoV-2: дельта ($n = 750$), альфа ($n = 302$), бета/гамма ($n = 32$), а также другие варианты ($n = 416$). Полученные результаты полностью соответствуют данным полногеномного секвенирования, что указывает на высокие диагностические характеристики набора реагентов.

За период с 1 декабря 2020 г. по 30 сентября 2021 г. протестированы более 10 000 клинических образцов РНК SARS-CoV-2, собранных на территории г. Москвы и Московской области в рамках мониторинга распространения линий SARS-CoV-2 особой эпидемиологической значимости. Полученные результаты учтены по месяцам и представлены с указанием доли выявляемых вариантов (рис.). На

протяжении исследуемого периода (с декабря 2020 г. по сентябрь 2021 г.) наблюдали появление линий особой эпидемиологической значимости или отдельных имеющих функционально важное значение мутаций, изменение их встречаемости и дальнейшее вытеснение новыми вариантами вируса SARS-CoV-2. Так, среди образцов, полученных в декабре 2020 г. – январе 2021 г. не был обнаружен ни один изолят с мутациями, характерными для линий особой значимости, а в последующие несколько месяцев наблюдалось последовательное увеличение доли отдельных линий в каждом периоде по сравнению с предыдущим. За пять месяцев доля образцов РНК SARS-CoV-2, содержащих мутации, характерные для линий бета/гамма, изменилась с 0 до 1,6%, а доля образцов, относящихся к линии альфа, выросла с 0 до 19,2%. Доля варианта дельта резко возросла до 25% к концу мая, достигла 87% к середине июня 2021 г., превысила 95% в первую неделю июля и была выше 99% в последующие месяцы до конца исследуемого периода.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Появление новых вариантов SARS-CoV-2 вызывает серьезную озабоченность во всем мире, так как новые линии потенциально могут иметь более высокую трансмиссивность, влиять на длительность и тяжесть заболевания, снижать эффективность вакцин, увеличивать показатели смертности [6, 7, 14–20, 24].

В настоящее время полногеномное секвенирование представляет собой наиболее распространенный универсальный метод выявления новых вариантов SARS-CoV-2. К сожалению, это очень трудоемкий, дорогостоящий и требующий больших временных затрат метод. ОТ-ПЦР представляет собой эффективную альтернативу, подходящую для выявления ранее охарактеризованных мутаций (маркеров основных линий), детекция которых важна для мониторинга распространения геновариантов и понимания эпидемиологической обстановки.

В результате проделанной работы создана диагностическая система в формате ОТ-ПЦР в реальном времени для выявления мутаций, которые имеют функциональное значение и позволяют определить генетические линии VOC коронавируса SARS-CoV-2. Анализ состоит из этапов выделения РНК, обратной транскрипции РНК, амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени и интерпретации результатов.

Представленный набор позволяет дифференцировать РНК коронавируса SARS-CoV-2 вариантов альфа, бета/

гамма и дельта от других генетических линий по выявляемым сочетаниям характерных мутаций. По данным ряда исследований [15–23], наличие отдельных мутаций (E484K, N501Y, P681H, P681R), связанных с другими генетическими вариантами коронавируса, приводит к имеющим функциональное значение изменениям в структуре S-белка — например, способствующих увеличению трансмиссивности вируса и снижению эффективности его нейтрализации антителами, выработанными при инфекции другими ранее распространенными вариантами вируса или вакцинации. Поэтому выявление данных мутаций отдельно без учета их сочетаний также имеет эпидемиологическое значение.

Набор имеет высокую аналитическую чувствительность (1×10^3 копий/мл РНК SARS-CoV-2) для каждого из определяемых генетических вариантов и 100%-ю аналитическую специфичность в рамках протестированной панели микроорганизмов. Диагностическая чувствительность с 95%-й доверительной вероятностью составила 94,2–100% для линии дельта, 91,1–100% для линии альфа, 89,9–100% для линий бета/гамма, а диагностическая специфичность с 95%-й доверительной вероятностью — 96,4–100%.

Применение разработанного набора реагентов в рамках эпидемиологического мониторинга позволило своевременно отследить появление штаммов SARS-CoV-2 варианта дельта в г. Москве в апреле 2021 г. и оперативно отразить динамику резкого роста доли штаммов дельта среди вариантов SARS-CoV-2, выявляемых у обследуемых в Московском регионе. Необходимо отметить, что возникновение и дальнейшее распространение варианта дельта в России привело к практически полному вытеснению других линий коронавируса.

ВЫВОДЫ

В ЦСП ФМБА России разработан чувствительный, специфичный и простой в использовании набор реагентов «АмплиТест SARS-CoV-2 VOC v.2» для выявления мутаций в S-гене коронавируса, характерных для генетических линий альфа, бета/гамма и дельта, методом ОТ-ПЦР. Набор проверили на образцах РНК коронавируса, результаты исследования валидировали полногеномным секвенированием, получив полное совпадение. Применение разработанного набора реагентов позволяет быстро и эффективно анализировать распространение генетических линий коронавируса и, исходя из результатов, незамедлительно принимать соответствующие противоэпидемические меры.

Литература

1. Bogoch II, Watts A, Thomas-Bachli A, Huber C, Kraemer MUG, Khan K, et al. Pneumonia of unknown aetiology in Wuhan, China: potential for international spread via commercial air travel. *J Travel Med.* 2020; 27 (2): 1–3.
2. Hui DS, I Azhar E, Madani TA, Ntoumi F, Kock R, Dar O, et al. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health — The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *Int J Infect Dis.* 2020; 91: 264–6.
3. Rothan HA, Byrareddy SN. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *J Autoimmun.* 2020 May; 109:102433.
4. Sánchez CM, Gebauer F, Suñé C, Mendez A, Dopazo J, Enjuanes L. Genetic evolution and tropism of transmissible gastroenteritis coronaviruses. *Virology.* 1992 Sep; 190 (1): 92–105.
5. GISAID EpiFlu™ Database. Available from: <http://www.GISAID.org>.
6. World Health Organization. Available from: <https://www.who.int>.
7. Luring AS, Hodcroft EB. Genetic variants of SARS-CoV-2 — What do they mean? *JAMA.* 2021; 325: 529–31.
8. CDC 2021. Emerging SARS-CoV-2 variants. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/more/science-and-research/scientific-brief-emerging-variants.html>.
9. Grubaugh ND, Hodcroft EB, Fauver JR, Phelan AL, Cevik M. Public health actions to control new SARS-CoV-2 variants. *Cell.*

- 2021;184 (5): 1127–32.
10. Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, Iranzadeh A, Fonseca V, Giandhari J, et al. Emergence and rapid spread of a new severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) lineage with multiple spike mutations in South Africa. *MedRxiv*. 2020; 12.21.20248640.
 11. Nelson G, Buzko O, Spilman PR, Niazi K, Rabizadeh S, Soon-Shiong PR. Molecular dynamic simulation reveals E484K mutation enhances spike RBD-ACE2 affinity and the combination of E484K, K417N and N501Y mutations (501Y.V2 variant) induces conformational change greater than N501Y mutant alone, potentially resulting in an escape mutant. *bioRxiv*. 2021.01.13.426558.
 12. National Institute of Infectious Diseases of JAPAN Brief report 12.01.2021. Available from: <https://www.niid.go.jp/niid/images/epi/corona/covid19-33-en-210112.pdf>.
 13. Cherian S, Potdar V, Jadhav S, Yadav P, Gupta N, Das M, et al. Convergent evolution of SARS-CoV-2 spike mutations, L452R, E484Q and P681R, in the second wave of COVID-19 in Maharashtra, India. *Microorganisms*. 2021; 9 (7): 1542.
 14. Lacobucci G. Covid-19: New UK variant may be linked to increased death rate, early data indicate. *BMJ*. 2021; 372: n230.
 15. Santos JC, Passos GA. The high infectivity of SARS-CoV-2 B.1.1.7 is associated with increased interaction force between Spike-ACE2 caused by the viral N501Y mutation. *bioRxiv*. 2020.12.29.424708.
 16. Davies NG, Abbott S, Barnard RC, Jarvis CI, Kucharski AJ, Munday JD, et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science*. 2021; 372 (6538): eabg3055.
 17. Cele S, Gazy I, Jackson L, Hwa SH, Tegally H, Lustig G, et al. Escape of SARS-CoV-2 501Y.V2 from neutralization by convalescent plasma. *Nature*. 2021; 593 (7857): 142–6.
 18. Wibmer CK, Ayres F, Hermanus T, Madzivhandila M, Kgagudi P, Oosthuysen B, et al. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. *Nat Med*. 2021; 27: 622–5.
 19. Garcia-Beltran WF, Lam EC, St Denis K, Nitido AD, Garcia ZH, Hauser BM, et al. Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. *Cell*. 2021; 184 (9): 2372–2383.e9.
 20. Kissler S, Fauver JR, Mack C, Tai C, Breban MI, et al. Densely sampled viral trajectories suggest longer duration of acute infection with B.1.1.7 variant relative to non-B.1.1.7 SARS-CoV-2. Harvard University's DASH repository 2021. *medRxiv*. 2021.
 21. Callaway E, Mallapaty S. Novavax offers first evidence that COVID vaccines protect people against variants. *Nature*. 2021; 590: 17.
 22. Greaney AJ, Loes AN, Crawford KHD, Starr TN, Malone KD, Chu HY, et al. Comprehensive mapping of mutations to the SARS-CoV-2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human serum antibodies. *Cell Host Microbe*. 2021; 29 (3): 463–476.e6.
 23. Wu K, Werner AP, Moliva JI, Koch M, Choi A, et al. mRNA-1273 vaccine induces neutralizing antibodies against spike mutants from global SARS-CoV-2 variants. *BioRxiv*. 2021. 01.25.427948.
 24. Elbe S, Buckland-Merrett G. Data, disease and diplomacy: GISAID's innovative contribution to global health. *Global challenges* (Hoboken, NJ). 2017; 1: 33–46.
 25. Starr TN, Greaney AJ, Hilton SK, Ellis D, Crawford KHD, Diggins AS, et al. Deep mutational scanning of SARS-CoV-2 receptor binding domain reveals constraints on folding and ACE2 binding. *Cell*. 2020; 182 (5): 1295–1310.e20.
 26. You Y, Moreira BG, Behlke MA, Owczarzy R. Design of LNA probes that improve mismatch discrimination. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34 (8): e60.
 27. European Centre for Disease Prevention and Control, WHO Regional Office for Europe. Methods for the detection and identification of SARS-CoV-2 variants. 3 March 2021. ECDC and WHO Regional Office for Europe: Stockholm and Copenhagen. 2021.
 28. Van Pelt-Verkuil E, van Belkum A, Hays JP. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. Springer Science & Business Media. 2008; 330 p.
 29. Yuryev A. Methods in Molecular Biology: PCR Primer Design. Humana Press. 2007; 432 p.
 30. Kibbe WA. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res*. 2007. Available from: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>.
 31. Integrated DNA Technologies. OligoAnalyzer Tool. Available from: <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>.
 32. The mfold Web Server (Hosted by The RNA Institute, College of Arts and Sciences). Available from: <http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>.

References

1. Bogoch II, Watts A, Thomas-Bachli A, Huber C, Kraemer MUG, Khan K, et al. Pneumonia of unknown aetiology in Wuhan, China: potential for international spread via commercial air travel. *J Travel Med*. 2020; 27 (2): 1–3.
2. Hui DS, I Azhar E, Madani TA, Ntoumi F, Kock R, Dar O, et al. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health — The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *Int J Infect Dis*. 2020; 91: 264–6.
3. Rothan HA, Byrareddy SN. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *J Autoimmun*. 2020 May; 109:102433.
4. Sánchez CM, Gebauer F, Suñé C, Mendez A, Dopazo J, Enjuanes L. Genetic evolution and tropism of transmissible gastroenteritis coronaviruses. *Virology*. 1992 Sep; 190 (1): 92–105.
5. GISAID EpiFlu™ Database. Available from: <http://www.GISAID.org>.
6. World Health Organization. Available from: <https://www.who.int>.
7. Luring AS, Hodcroft EB. Genetic variants of SARS-CoV-2 — What do they mean? *JAMA*. 2021; 325: 529–31.
8. CDC 2021. Emerging SARS-CoV-2 variants. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/more/science-and-research/scientific-brief-emerging-variants.html>.
9. Grubaugh ND, Hodcroft EB, Fauver JR, Phelan AL, Cevik M. Public health actions to control new SARS-CoV-2 variants. *Cell*. 2021;184 (5): 1127–32.
10. Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, Iranzadeh A, Fonseca V, Giandhari J, et al. Emergence and rapid spread of a new severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) lineage with multiple spike mutations in South Africa. *MedRxiv*. 2020; 12.21.20248640.
11. Nelson G, Buzko O, Spilman PR, Niazi K, Rabizadeh S, Soon-Shiong PR. Molecular dynamic simulation reveals E484K mutation enhances spike RBD-ACE2 affinity and the combination of E484K, K417N and N501Y mutations (501Y.V2 variant) induces conformational change greater than N501Y mutant alone, potentially resulting in an escape mutant. *bioRxiv*. 2021.01.13.426558.
12. National Institute of Infectious Diseases of JAPAN Brief report 12.01.2021. Available from: <https://www.niid.go.jp/niid/images/epi/corona/covid19-33-en-210112.pdf>.
13. Cherian S, Potdar V, Jadhav S, Yadav P, Gupta N, Das M, et al. Convergent evolution of SARS-CoV-2 spike mutations, L452R, E484Q and P681R, in the second wave of COVID-19 in Maharashtra, India. *Microorganisms*. 2021; 9 (7): 1542.
14. Lacobucci G. Covid-19: New UK variant may be linked to increased death rate, early data indicate. *BMJ*. 2021; 372: n230.
15. Santos JC, Passos GA. The high infectivity of SARS-CoV-2 B.1.1.7 is associated with increased interaction force between Spike-ACE2 caused by the viral N501Y mutation. *bioRxiv*. 2020.12.29.424708.
16. Davies NG, Abbott S, Barnard RC, Jarvis CI, Kucharski AJ, Munday JD, et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science*. 2021; 372 (6538): eabg3055.

17. Cele S, Gazy I, Jackson L, Hwa SH, Tegally H, Lustig G, et al. Escape of SARS-CoV-2 501Y.V2 from neutralization by convalescent plasma. *Nature*. 2021; 593 (7857): 142–6.
18. Wibmer CK, Ayres F, Hermanus T, Madzivhandila M, Kgagudi P, Oosthuysen B, et al. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. *Nat Med*. 2021; 27: 622–5.
19. Garcia-Beltran WF, Lam EC, St Denis K, Nitido AD, Garcia ZH, Hauser BM, et al. Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. *Cell*. 2021; 184 (9): 2372–2383.e9.
20. Kissler S, Fauver JR, Mack C, Tai C, Breban MI, et al. Densely sampled viral trajectories suggest longer duration of acute infection with B.1.1.7 variant relative to non-B.1.1.7 SARS-CoV-2. Harvard University's DASH repository 2021. medRxiv. 2021.
21. Callaway E, Mallapaty S. Novavax offers first evidence that COVID vaccines protect people against variants. *Nature*. 2021; 590: 17.
22. Greaney AJ, Loes AN, Crawford KHD, Starr TN, Malone KD, Chu HY, et al. Comprehensive mapping of mutations to the SARS-CoV-2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human serum antibodies. *Cell Host Microbe*. 2021; 29 (3): 463–476.e6.
23. Wu K, Werner AP, Moliva JI, Koch M, Choi A, et al. mRNA-1273 vaccine induces neutralizing antibodies against spike mutants from global SARS-CoV-2 variants. *BioRxiv*. 2021. 01.25.427948.
24. Elbe S, Buckland-Merrett G. Data, disease and diplomacy: GISAID's innovative contribution to global health. *Global challenges* (Hoboken, NJ). 2017; 1: 33–46.
25. Starr TN, Greaney AJ, Hilton SK, Ellis D, Crawford KHD, Dingens AS, et al. Deep mutational scanning of SARS-CoV-2 receptor binding domain reveals constraints on folding and ACE2 binding. *Cell*. 2020; 182 (5): 1295–1310.e20.
26. You Y, Moreira BG, Behlke MA, Owczarzy R. Design of LNA probes that improve mismatch discrimination. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34 (8): e60.
27. European Centre for Disease Prevention and Control, WHO Regional Office for Europe. Methods for the detection and identification of SARS-CoV-2 variants. 3 March 2021. ECDC and WHO Regional Office for Europe: Stockholm and Copenhagen. 2021.
28. Van Pelt-Verkuil E, van Belkum A, Hays JP. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. Springer Science & Business Media. 2008; 330 p.
29. Yuryev A. Methods in Molecular Biology: PCR Primer Design. Humana Press. 2007; 432 p.
30. Kibbe WA. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res*. 2007. Available from: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>.
31. Integrated DNA Technologies. OligoAnalyzer Tool. Available from: <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>.
32. The mfold Web Server (Hosted by The RNA Institute, College of Arts and Sciences). Available from: <http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>.