

БИОТЕХНОЛОГИЯ**BIOTECHNOLOGY**

УДК: 616.9:578(575.2)(04)

*Джумаканова Айгуль Бейшебаевна,**соискатель Института биотехнологии НАН КР**Джумаканова Айгуль Бейшебаевна,**Кыргыз Республикасынын Улуттук илимдер академиясынын**Биотехнология институтунун изденүүчү**Dzhumakanova Aigul Beishebaevna**candidate of the Institute of Biotechnology of the National Academy of Sciences**of the Kyrgyz Republic***ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА COVID-19****В КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ**

Аннотация. Целью настоящей работы было проанализировать особенности циркуляции вируса коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 на территории Кыргызской Республики. Динамика роста лабораторных исследований зависит от роста заболеваемости и генетических линий нового коронавируса SARS-CoV-2. За период 2020 г по 2022г проведено лабораторное обследование 2 552 212 образцов на COVID-19 методом РТ-ПЦР. Для геномного мониторинга SARS-CoV-2 положительные образцы ОТ-ПЦР исследования были отправлены для подтверждения и генетического секвенирования.

Ключевые слова: коронавирусная инфекция, SARS-CoV-2, РТ-ПЦР.

КЫРГЫЗ РЕСПУБЛИКАСЫНДАГЫ КОВИД-19**ЛАБОРАТОРИЯЛЫК ДИАГНОСТИКАСЫ**

Аннотация. Бул иштин максаты SARS-CoV-2 коронавирустук инфекциясынын Кыргыз Республикасынын аймагында жүгүртүү өзгөчөлүктөрүн талдоо болгон.

Лабораториялык изилдөөлөрдүн өсүү динамикасы жаңы SARS-CoV-2 коронавирустун оорусунун жана генетикалык линияларынын көбөйүшүнөн көз каранды. 2020-2022-жылдар аралыгында РТ-ПЦР ыкмасы менен COVID-19га 2 552 212 үлгүгө лабораториялык изилдөө жүргүзүлгөн. SARS-CoV-2 геномдук мониторинги үчүн ОТ-ПЦР оң үлгүлөрү тастыктоо жана генетикалык секвенирлөө үчүн жөнөтүлдү.

Негизги сөздөр: коронавирустук инфекция, SARS-CoV-2, РТ-ПЦР.

LABORATORY DIAGNOSIS OF COVID-19

IN THE KYRGYZ REPUBLIC

Abstract. The purpose of this project was to analyze the features of the circulation of the SARS-CoV-2 coronavirus infection in the territory of the Kyrgyz Republic. The growth dynamics of laboratory research depends on the increase in the incidence and genetic lines of the new SARS-CoV-2 coronavirus. For the period from 2020 to 2022, a laboratory investigation of 2,552,212 samples of COVID-19 was carried out using the RT-PCR method. For SARS-CoV-2 genomic monitoring, positive RT-PCR samples were sent for confirmation and genetic sequencing.

Keywords: coronavirus infection, SARS-CoV-2, RT-PCR.

Введение

С момента начала пандемии новой коронавирусной инфекции COVID-19 во всем мире стратегия противостояния пандемии в разных странах имеет свои особенности. Сложность управления эпидпроцессом, необходимость пересмотра тактики диагностики, лечения и противоэпидемических мер обусловлены частотой мутаций вируса SARS-CoV-2 [1, 2].

Тесные социально-экономические связи, миграция населения влияют на циркуляцию коронавируса SARS-CoV-2, особенно вариантов вызывающих интерес (ВВИ) или вызывающих озабоченность (ВВО).

Обеспечение своевременной лабораторной диагностики и проведение углубленных филогенетических исследований позволяют провести прогнозирование динамики COVID-19 и принятие своевременных превентивных мер [3, 4, 5].

Вышеуказанные факторы определяют актуальность геномного мониторинга вируса коронавирусной инфекции SARS-CoV-2.

Материалы и методы исследования

В республике ПЦР диагностику COVID-19 проводят 14 государственных и 8 частных лаборатории и всего за 2020-2021 гг. обследованы 2 552 212 образцов, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

Для проведения обследования использованы мазки из носоглотки, мокрота и аутопсийный материал в вирусологической транспортной среде от лиц с подозрением на COVID-19, контактные и с профилактической целью для лиц выезжающих за пределы республики, отвечающих стандартному определению случая, согласно рекомендаций ВОЗ.

Из-за отсутствия местного производителя для диагностики COVID-19 методом ОТ-ПЦР были использованы зарегистрированные коммерческие тест-системы: ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией «Вектор-ПЦРrv-2019-nCoV-RG» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирск, Кольцово), ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией «Вектор-OneStep ПЦР-CoV-RG» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирск, Кольцово), «ОТ-ПЦР в режиме реального времени РеалБест РНК SARS-CoV-2» (АО «Вектор-Бест»), «ОТ-ПЦР в режиме реального времени SARS-CoV-2/SARS-CoV» (ООО «ДНК-Технология-ТС», Москва), ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией «АмплиСенс® Cov-Bat-FL» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва), «SunsureBiotech» (КНР), «BioSpeedy» (Турция), WHO (Германия), «Алсенс» (Республика Беларусь).

Амплификация и учет реакции проводили на приборах планшетного и роторного типа: RotorGene, Biorad, DT-96 и GeneXpert при экстренных ситуациях.

Для определения вариантов, вызывающих интерес (ВВИ) или вызывающих озабоченность (ВВО) положительные образцы были отправлены на секвенирование в ведущие референс лаборатории ВОЗ: референс-центр по мониторингу за коронавирусами болезнями (ТОРС, БВРС и др.) ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Новосибирск, РФ), НИИ Шарите (Германия), в Лондон.

Репрезентативность отбора образцов для секвенирования был обеспечен согласно критериев, рекомендованных ВОЗ.

По отчетным данным результатов протокола секвенирования референс-центра по мониторингу за коронавирусами болезнями (ТОРС, БВРС и др.) ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Новосибирск, РФ) предварительная оценка качества биологического материала проводили с помощью ПЦР в режиме реального времени на приборе Rotor-Gene Q с использованием олигонуклеотидных праймеров и зондов к гену E. Для секвенирования отбирали пробы с условным показателем порогового цикла Ct не больше 30. Полногеномное секвенирование проводилась по протоколу ARTIC v3 (COVID-19 ARTICv3 Illumina library construction and sequencing protocol V.5) с двумя пулами олигонуклеотидных праймеров, покрывающими весь геном SARS-CoV-2. Для проведения амплификации использованы наборы реагентов Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs, Великобритания). Полученные фрагменты двухцепочечной ДНК очищены от неизрасходованных компонентов и продуктов реакции с помощью AMPurebeads (Beckman Coulter, США), измеряли концентрацию нуклеиновых кислот

с помощью Qubit 3.0 с применением набора реагентов Qubitds DNA HS Assaykit (Thermo Fisher Scientific, США) и затем использовали для подготовки библиотек NGS.

Для подготовки библиотек использовали метод лигирования Y-образных адаптеров (Illumina). Секвенирование проводили на платформе MiSeq (Illumina) с использованием набора для секвенирования MiSeqReagentKit v2 (500-cycles) (Illumina, США).

Анализ последовательностей фрагментов вируса проводили при помощи пакета MIRA(v.4.9.6), BWA(v.0.7.15), IGV(v..2.3.78), Samtools (v.1.3.1), GenomeAnalysisTk (v.3.6) [McKenna et al., 2010]. Выравнивание полногеномных последовательностей проводили при помощи Ugene (v. 1.24.1) с помощью алгоритма MAFFT.

Всего за 2020-2021 гг. методом секвенирования были исследованы 570 клинических образцов с положительным результатом на SARS-CoV-2.

Результаты и обсуждения

Ретроспективный анализ данных результатов генетического секвенирования 570 образцов и данных заболеваемости COVID-19 показал, что в период «завоза» в 2020 г циркулировали 3 варианта вирусов циркулирующих на территории 1-й вариант Швеция, Россия; 2-й вариант- США, ОАЭ, Швеция и 3-й вариант- Оман.

В пик эпидемического подъема заболеваемости в июле 2020 г 30323 случаев в июне – июле 2021 г. от 20274 до 37889 циркулировал вариант В коронавируса SARS-CoV-2 (рис.1).

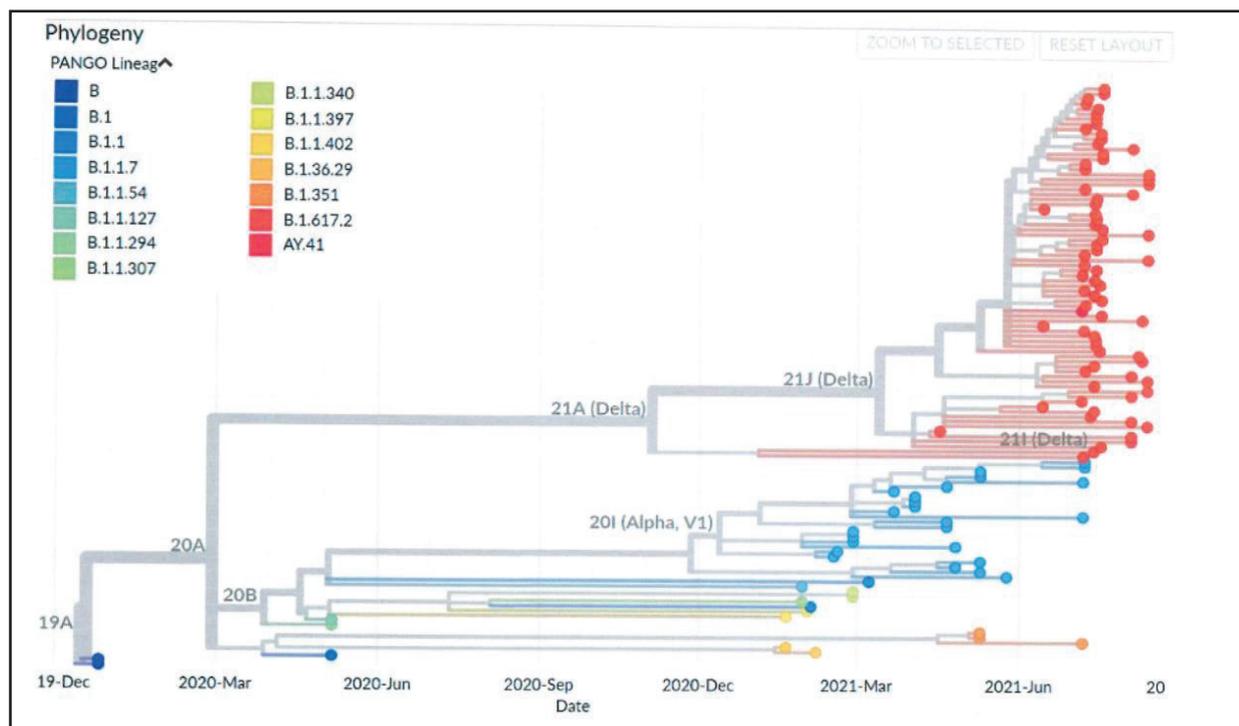


Рис. 1. Филогенетический анализ разнообразия генотипов вируса SARS-CoV-2 Кыргызской Республике

Согласно полученным данным, в образцах, собранных за июнь-август 2021 года, преобладает «Индийский вариант» (B. 1.617.2, Delta), с преобладанием классического B. 1.617.2. Также выявлен один вариант AY.1, который характеризуется наличием дополнительной мутации K417N в гене S по отношению к классическому варианту B. 1.617.2. По результатам исследования образцов, взятых в июне-июле 2021 года, у

которых был определен полный геном (66 последовательностей), встречались варианты «Британский» (B. 1.1.7, Alpha, 4 образца) и «Южно-африканский» (B. 1.351, Beta, 1 образец), а в пробах за август 2021 года (21 полный геном) они уже не обнаружены. Данные свидетельствуют совпадение с общемировой тенденцией доминирования варианта Delta, вызвавшего новую волну заболеваемости COVID-19 в мире (рис. 2).

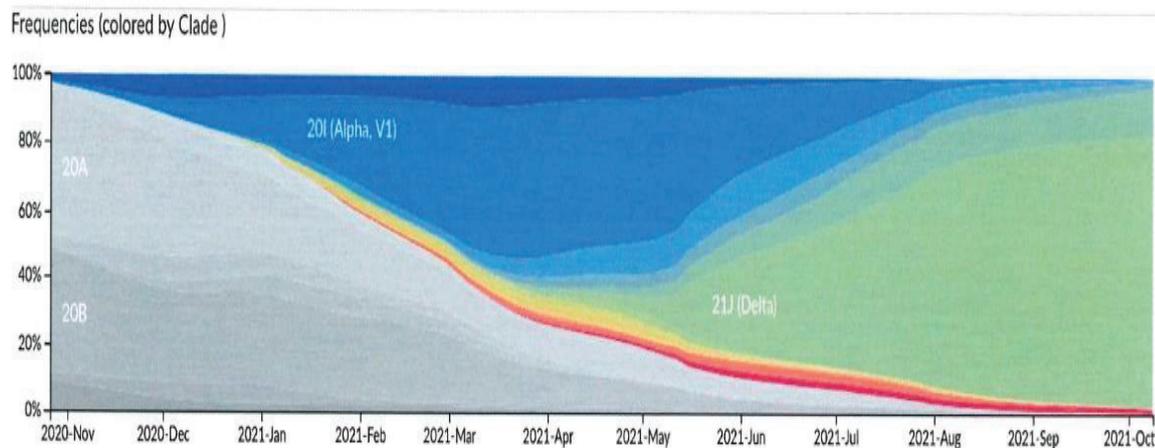


Рис.2. Распространенность «Британского» (B.1.1.7, Alpha) и «Индийского» (B.1.617.2, Delta) вариантов SARS-Cov-2

Эпидемический подъём в январе-феврале 2022г как во многих странах обусловлен преимущественной циркуляцией варианта Омикрон ВА.1.1 (65 последовательностей) (рис.3).

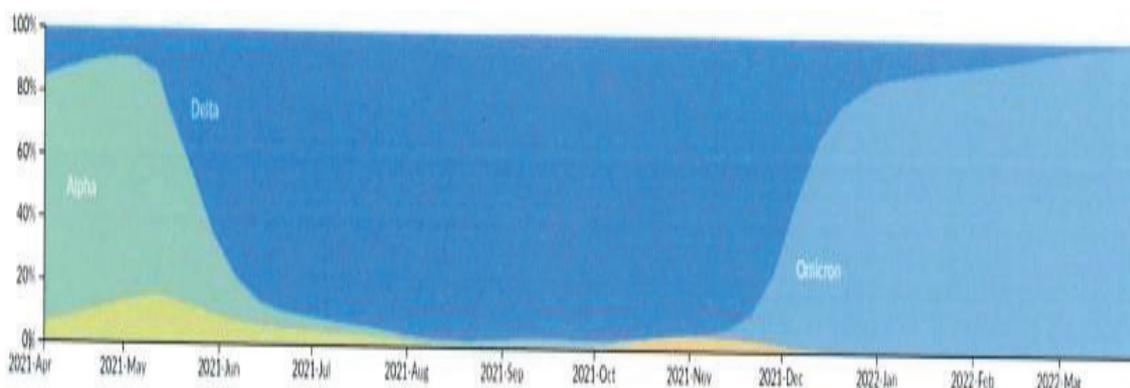


Рис.3. График изменения частот встречаемости различных вариантов SARS-CoV-2, выделенных в Кыргызской Республике за все время исследования

По данным результатов исследования референс-центра по мониторингу за коронавирусными болезнями (ТОРС, БВРС и др.) ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Новосибирск, РФ) в образцах за январь-декабрь 2022 г в 74 полногеномных последовательностях были обнаружены 242 мутации.

Выявленные основные мутации: c14408t, приводящая к замене P4715L в белке ORFlab_pplab (в 74 изолятах); c10029t, приводящая к замене T3255I в белке ORFlab_pplab (в 74 изолятах); a23403g, приводящая к замене D614G в белке S (в 73 изолятах); c22995a, приводящая к замене T478K в белке S (в 71 изолятах); c21846t, приводящая к замене T95I в белке S (в 69 изолятах); c21762t, приводящая к замене A67V в белке S (в 67 изолятах); делеция atacatgt21764at, приводящая к замене H69_V70del в белке S (в 67 изолятах); g22578a, приводящая к замене G339D в белке S (в 65 изолятах); синонимичная мутация c25000t, приводящая к замене D1146D в белке S (в 65 изолятах); a24424t, приводящая к замене Q954N в белке S (в 65 изолятах); c24130a, приводящая к замене N856K в белке S (в 65 изолятах); t23599g, приводящая к замене N679K в белке S (в 65 изолятах); a2832g, приводящая к замене K856R в белке ORFlab_pplab (в 65 изолятах); c10449a, приводящая к замене

P3395H в белке ORFlab_pplab (в 65 изолятах); c23604a, приводящая к замене P681H в белке S (в 65 изолятах); c26270t, приводящая к замене T9I в белке E (в 65 изолятах); a18163g, приводящая к замене I5967V в белке ORFlab_pplab (в 65 изолятах); c23525t, приводящая к замене H655Y в белке S (в 65 изолятах); all537g, приводящая к замене I3758V в белке ORFlab_pplab (в 65 изолятах); g8393a, приводящая к замене A2710T в белке ORFlab_pplab (в 64 изолятах); c24503t, приводящая к замене L981F в белке S (в 64 изолятах); c23202a, приводящая к замене T547K в белке S (в 64 изолятах).

Данные исследования представляют научно-практический интерес для здравоохранения, требуют проведения анализа в разрезе с тяжестью клиники, вероятности повторного заражения, вакцинного статуса и других эпидемиологических критериев.

К настоящему времени в республике остаётся не решёнными проблемы оснащённости лабораторий для проведения полногеномного секвенирования из-за низкой обеспеченности реагентами, что непосредственно влияет на возможность исследовать особенности течения, вероятности повторного заражения, устойчивости к факторам окружающей среды, в том числе к противовирусным препаратам и дезинфицирующим средствам.

Выводы

1. За 2020-2021 гг в Кыргызской Республике были исследованы 570 образцов методом генетического секвенирования.

2. В июнь-июль 2021г подъем случаев заболеваемости COVID-19 обусловлен вариантом В. 1.617.2, Delta.

3. Эпидемический подъем в январе-феврале 2022г как во многих странах обусловлен преимущественной циркуляцией варианта Омикрон ВА.1.1.

4. В стране существует проблема обеспеченности реагентами для проведения полногеномного секвенирования.

Литература

1. *Ilmjärv S., Abdul F., Acosta-Gutiérrez S., Estarellas C., Galdadas I., Casimir M., et al.* Epidemiologically most successful SARS-CoV-2 variant: concurrent mutations in RNA-dependent RNA polymerase and spike protein. medRxiv. Preprint. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.08.23.20180281>

2. *Speranskaya A., Kaptelova V., Valdokhina A., Bulanenko V., Samoilo A., Korneenko E., et al.* SCV-2000bp: a primer panel for SARS-CoV-2 full-genome sequencing. bioRxiv. Preprint. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.08.04.234880>

3. *Яцьшина С.Б. I, Мамошина М.В. I, Елькина М.А. I, др.* Распространённость возбудителей ОРВИ, гриппа и COVID-19 у лиц без симптомов респираторной инфекции, Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2021; 98(4) DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-152>. С. 383-396.

4. *Kumar M., Taki K., Gahlot R., Sharma A., Dhangar K.* A chronicle of SARS-CoV-2: Part-I — epidemiology, diagnosis, prognosis, transmission and treatment. Sci. Total Environ. 2020; 734: 139278. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139278>

5. *Li Q., Tang B., Bragazzi N.L., Xiao Y., Wu J.* Modeling the impact of mass influenza vaccination and public health interventions on COVID-19 epidemics with limited detection capability. Math. Biosci. 2020; 325: 108378.