

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра – Главный
государственный санитарный врач
Республики Беларусь

С.В. Нечай

2024 г.

Регистрационный № 014-0624



АЛГОРИТМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ
ВАРИАНТОВ ВИРУСА SARS-COV-2

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ - РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ:

д-р. биол. наук, доц. Гасич Е.Л., Булда К.Ю., Коско А.Д.

Минск 2024

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен алгоритм определения генетических вариантов вируса SARS-CoV-2 с последующим секвенированием и биоинформационным анализом.

Инструкция предназначена для врачей-вирусологов и иных специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с COVID-19.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Для оказания комплекса медицинских услуг, направленных на диагностику COVID-19 (МКБ-10 – B34.2.).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Отсутствуют.

ПЕРЕЧЕНЬ ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ, РЕАКТИВОВ, РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ И ДР

Изделия медицинской техники:

термоциклер с возможностью проведения ПЦР в режиме реального времени;

центрифуга для микропробирок;

центрифуга с охлаждением для микропробирок на 14000 об/мин;

ламинарные боксы;

аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле с источником питания;

гельдокументирующая система;

дозаторы механические переменного объема, комплект (от 0,1 до 10 мкл, от 20 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл);

мини центрифуга-вортекс;

твердотельный термостат;
генетический анализатор по Сэнгеру;
прибор для высокопроизводительного секвенирования;
флуориметр;
холодильник с морозильной камерой (от +2°C до +8°C, от минус 18°C до минус 25°C);
бактерицидная лампа.

Изделия медицинского назначения:

пробирки стерильные пластиковые типа «Эплендорф» (1,5 мл);
микропробирки для проведения ПЦР (0,2 мл), стерильные, свободные от нуклеаз;
микропробирки с транспортной средой;
наконечники для дозаторов пипеточных с фильтром, стерильные, свободные от нуклеаз;
набор реагентов для экстракции РНК методом сорбции на магнитных частицах;
набор реагентов качественного выявления РНК SARS-CoV-2, методом одностадийной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»;
набор реагентов для обратной транскрипции;
реагенты для проведения ПЦР;
регенты для проведения электрофоретической детекции (агароза для электрофореза, маркер молекулярного веса 50 – 1500 п.о., загрузочный буфер, ТАЕ-буфер, бромистый этидий);
реагенты для проведения ферментативной очистки продуктов после ПЦР;
реагенты для проведения секвенирующей ПЦР и очистки продуктов после секвенирующей ПЦР;

реагенты для выделения и подготовки библиотек ампликонов для последующего высокопроизводительного секвенирования;

реагенты для индексирования библиотек;

реагенты для очистки библиотек магнитными частицами;

реагенты для измерения концентрации нуклеиновых кислот на флуориметре;

штативы для пробирок;

магнитный штатив;

халаты, респираторы, перчатки резиновые;

программное обеспечение для анализа нуклеотидных последовательностей: Sequensing Analysis Software V.6, BioEdit V.7.2;

утилиты и библиотеки: kromsatel.py, bowtie2, samtools, pilon-1.24, consensus-highlighter.py, bcftools.

Качество используемых реагентов должно соответствовать техническим требованиям, предъявляемым к реагентам для проведения молекулярно-генетических исследований.

ТЕХНОЛОГИЯ РЕАЛИЗАЦИИ МЕТОДА

Основной целью является определение генетических вариантов вируса SARS-CoV-2, циркулирующих в стране. Мониторинг циркулирующих вариантов вируса SARS-CoV-2 необходим для обнаружения и оценки вариантов вируса, которые могут привести к повышению уровня трансмиссивности, тяжести течения заболевания или иных неблагоприятных последствий. Получение своевременной и достоверной информации о появлении и распространении вариантов, вызывающих интерес (ВВИ) и/или обеспокоенность (ВБО) требует надежных систем мониторинга: секвенирование генома SARS-CoV-2 (частичное или полное) с определённой стратегией отбора проб для получения надежных и репрезентативных результатов. Генетический анализ – это единственный способ идентифицировать и охарактеризовать новые варианты и однозначно

типировать уже имеющиеся. Для подтверждения заражения конкретным вариантом требуется секвенирование целого генома SARS-CoV-2 или как минимум всего S гена либо его части. Алгоритм, изложенный в данной инструкции, включает следующие этапы.

1 этап.

- полуколичественное/количественное определение РНК вируса SARS-CoV-2 в назофарингеальном мазке, взятым у пациента с подтверждённым диагнозом COVID-19 для отбора образцов со значением порогового цикла амплификации не более 25. В приоритетном порядке исследуется материал от лиц, прибывших из-за рубежа и их контактов; от лиц с подозрением на повторное инфицирование SARS-CoV-2; от лиц, инфицированных (с признаками и без признаков заболевания), спустя 30 и более суток после вакцинации; от пациентов с неэффективностью лечению препаратами на основе специфических антител; от всех лиц с нетипичным течением заболевания (длительная вирусемия более 21 дня, наличие симптомов со стороны ЖКТ, нервной системы и др.) без сопутствующей патологии; от 3-5 лиц из крупных эпидемических очагов, с одновременным выявлением 20 и более случаев; от работников зверохозяйств; систематический ежедневный сбор положительных образцов (не менее 2% от всех положительных образцов).

2 этап.

- определение генетического варианта вируса SARS-CoV-2 на основании анализа данных частичного секвенирования S-участка генома вируса.

3 этап.

- определение однонуклеотидных полиморфизмов, характерных для известных генетических вариантов, в случае ухудшения эпидемиологической обстановки и значительного увеличения объема исследований;

- генотипирование новых ранее не циркулирующих вариантов SARS-CoV-2, или вариантов, имеющих новые мутации, на основании анализа данных полногеномной последовательности вируса.

Схема алгоритма генотипирования вируса SARS-CoV-2 представлена на рисунке 1.

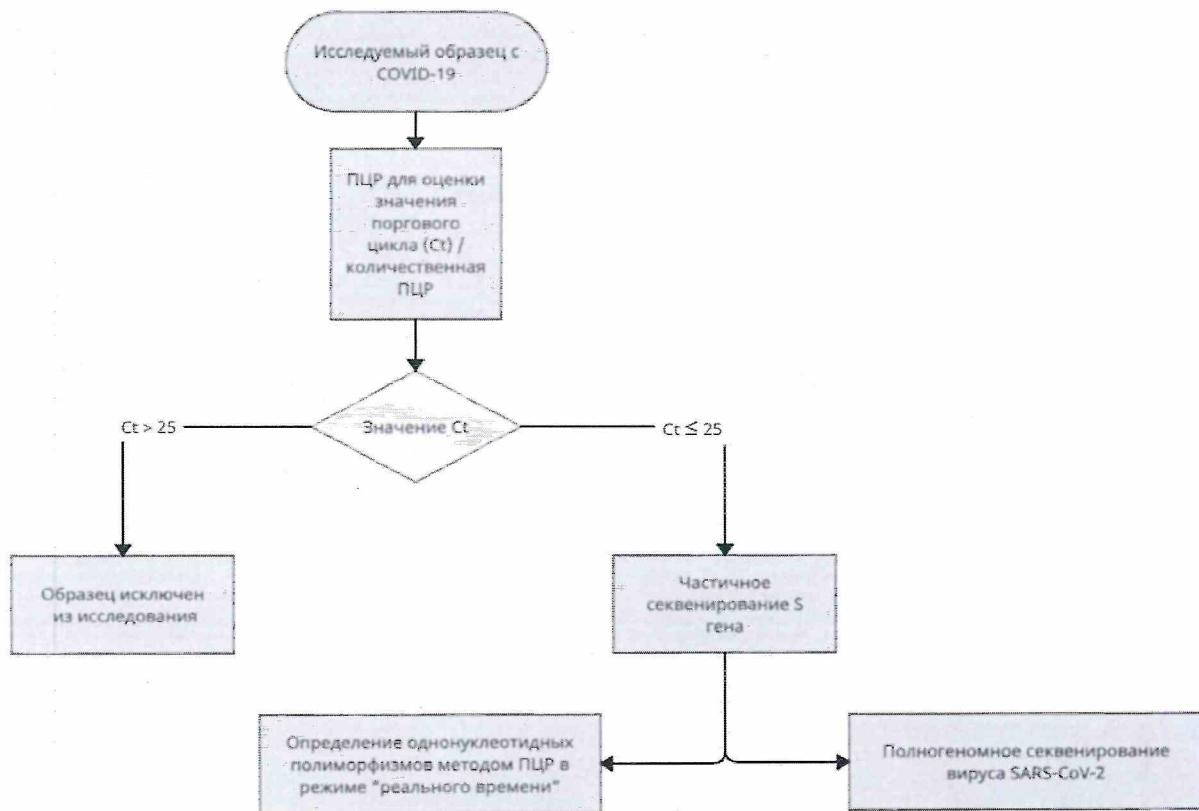


Рисунок 1 – Схема алгоритма генотипирования вируса SARS-CoV-2

1.1 Правила забора, транспортировки и хранения биологического материала

Мазок из зева собирают натощак или через 3 - 4 ч после приема пищи с использованием стандартных методик. Полученный материал может храниться при температуре от +2°C до +8°C – не более недели. Транспортировка материала осуществляется в специальных контейнерах, с использованием хладоэлементов для поддержания температуры биологического материала не более от +2°C до +8°C, обеспечивающих безопасность медработника.

1.2 Определение и отбор образцов, с высоким содержанием РНК вируса SARS-CoV-2 методом в режиме «реального времени»

Определение наличия РНК вируса SARS CoV-2 в исследуемом образце проводится в соответствии с инструкцией коммерческой тест-системы, предназначеннной для качественного/количественного определения РНК в образце, выделенном из клинического материала. Отбор образцов для дальнейшего генотипирования осуществляется по значению порогового числа циклов ПЦР (C_t) ≤ 25 . Образцы, имеющие (C_t) > 25 , из дальнейшей работы исключаются.

1.3 Генотипирование SARS-CoV-2 на основании частичного секвенирования S участке генома вируса

1.3.1 Экстракция РНК вируса SARS-CoV-2 назофарингеального мазка

Выделение РНК SARS CoV-2 проводится в соответствии с инструкцией коммерческой тест-системы, предназначеннной для выделения РНК из клинического материала.

1.3.2 Амплификация S участка генома вируса SARS-CoV-2 с последующим секвенированием и молекулярно-генетическим биоинформационным типированием

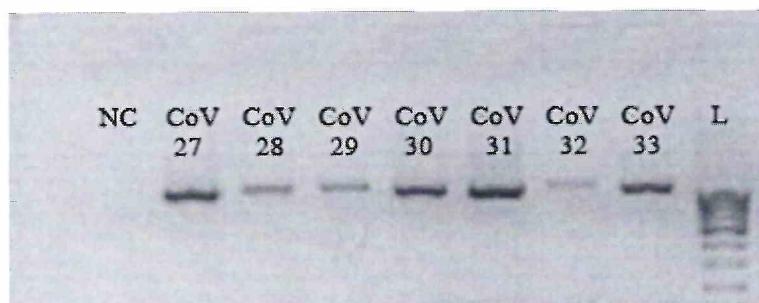
1.3.2.1 Проведение реакции обратной транскрипции и амплификации участка S гена вируса SARS-CoV-2

Для этапа обратной транскрипции готовится реакционная смесь следующего состава: случайный гексамер 1 мкМ, смесь дНТФ каждый в концентрации 0,5 мМ; 1Х ОТ-буфер, MgCl₂ 3мМ, MMLV-ревертаза – 1,6 ед./мкл, ингибитор РНКаз 0,8 ед/мкл, деионизированная вода; 10 мкл выделенной РНК вируса SARS-CoV-2 из образца. Конечный объем реакционной смеси 25 мкл. Условия проведения реакции обратной транскрипции: ревертирование при 25°C – 10 мин и 54°C – 40 мин, инактивация ревертазы при 85°C – 5 мин, хранение при 4°C.

Для амплификации кДНК используются последовательности праймеров: 5' – GAAAATGGAACCATTACAGATGCTGT – 3' (Прямой) и 5' – CACTGACACCACCAAAAGAACATG – 3' (Обратный).

Объем реакционной смеси – 25 мкл со следующими компонентами для ПЦР: 1Х буфер, 2 мМ MgCl₂, 0,2 мМ смесь дНТФ, 0,4 мМ праймеры (прямой и обратный), 0,04 ед/мкл Таq-полимеразы, деионизированная вода, 2,5 мкл кДНК-матрица. Временные и температурные режимы для амплификации участка S гена SARS CoV-2: начальная денатурация при 95°C 2 мин, 35 циклов (денатурация 95°C – 10 сек, отжиг праймеров 57°C – 10 сек, элонгация 72°C – 1 мин 10 сек), конечная элонгация при 72°C – 5 мин, хранение при 4°C.

Анализ продуктов амплификации осуществляется методом электрофореза в 1,7% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием и детекцией в трансиллюминаторе (рисунок 1).



CoV: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 – исследуемые образцы; NC – отрицательный контроль; L – маркер молекулярного веса

Рисунок 1 – Результаты электрофоретической детекции ампликонов участка S гена SARS-CoV-2 – 949 п.н.

1.2.2.2 Секвенирование и биоинформационный анализ

Очистка продуктов амплификации осуществляется ферментативным методом, согласно инструкции производителя. Секвенирующая ПЦР проводится в объеме 10 мкл с использованием 2мМ прямого или обратного праймера, 10 нг ПЦР продукта и реагентов в составе набора для проведения секвенирующей ПЦР. Температурные и временные условия проведения реакции секвенирующей ПЦР устанавливаются в соответствии с инструкцией производителя. Продукты секвенирующей ПЦР очищаются от не включенных

нуклеотидов методом спиртовой преципитации. К очищенной пробе добавляют 20 мкл высокоочищенного формамида. Подготовленные пробы вносят по 10 мкл в планшет генетического анализатора.

1.3.2.3 Определение мутаций в S участке генома SARS CoV-2

Электрофорез очищенных фрагментов после секвенирующей ПЦР проводится на генетическом анализаторе серии 3500 (Applied Biosystems, США). Анализ нуклеотидных последовательностей осуществляется с использованием программных продуктов Sequensing Analysis Software V.6, BioEdit V.7.2. Полученные нуклеотидные последовательности вируса SARS-CoV-2 в формате fasta загружается на электронный ресурс <https://clades.nextstrain.org/>. Определение генетического варианта осуществляется согласно классификации Pango и Всемирной организации здравоохранения с указанием данных о наличии нуклеотидных и аминокислотных замен (рисунок 2).

#	i	Sequence name	QC	Clade	Pango lineage (Nextclade)	WHO name	Mut.	Cov.	Gene	CDS	S
0	0	CoV_27	N M P C F S	21J	AY.4	Delta	3	3.0%			
1	1	CoV_28	N M P C F S	21I	AY.9.2	Delta	4	2.9%			
2	2	CoV_29	N M P C F S	20I	B.1.1.7	Alpha	3	3.0%			
3	3	CoV_30	N M P C F S	21L	BA.2	Omicron	18	3.1%			
4	4	CoV_31	N M P C F S	22B	BA.5.2	Omicron	17	2.3%			
5	5	CoV_32	N M P C F S	23A	XBB.1.5	Omicron	26	3.0%			
6	6	CoV_33	N M P C F S	20B	XBB.1.16	Omicron	27	3.0%			

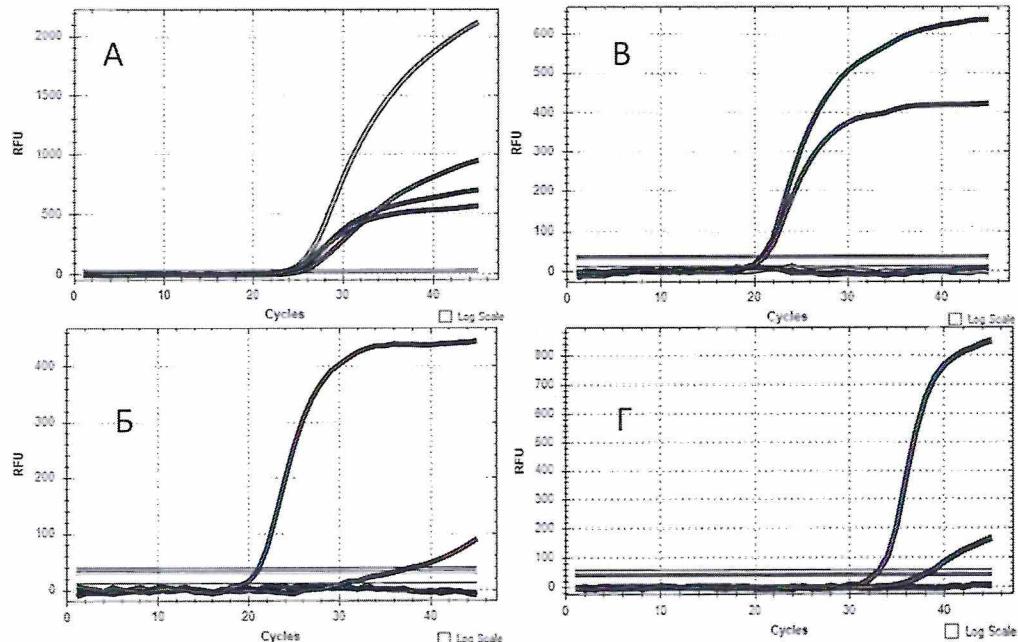
Рисунок 2 – Результаты определения генетических вариантов SARS-CoV-2 на основании данных частичного секвенирования S-участка генома с использование электронного ресурса clades.nextstrain.org

1.4 Определения генетического варианта вируса SARS-CoV-2 на основании данных однонуклеотидных полиморфизмов вируса методом ПЦР в режиме «реального времени»

Альтернативным решением, позволяющим получить большой массив данных в короткие сроки, может быть определение однонуклеотидных полиморфизмов, характерных для отдельных вариантов вируса SARS-CoV-2, методом ПЦР-анализа в режиме «реального времени». Этот подход может быть использован и в случае отсутствия возможности массового проведения массовых геномных исследований. Однако важным ограничением является необходимость актуализации используемых праймеров для такого надзора.

С целью генотипирования разработан метод выявления однонуклеотидных полиморфизмов, результаты которого позволяют определить принадлежность исследуемых образцов к вариантам Дельта, Омикрон сублиний BA.1 и BA.2. Праймеры и гибридизационные зонды формата TaqMan были подобраны к трем диагностическим мишениям: отсутствие делеции 69/70 (канал HEX) и аминокислотной замены N501Y (канал ROX), наличие/отсутствие по участку N-гена РНК вируса SARS-CoV-2 (канал FAM), эндогенный контроль (канал Cy5). Интерпретация осуществляется на основе анализа характерных изменений в геноме вируса: наличия/отсутствия делеции 69/70 и мутации N501Y. При отсутствии делеции 69/70 (канал HEX) и мутации N501Y (канал ROX), наличие N белка SARS-CoV-2 (канал FAM) и эндогенного контроля (канал Cy5) происходит подъем уровня флуоресценции на графике. На рисунке 3 представлены примеры графиков, на основании анализа которых определяется генетический вариант вируса SARS-CoV-2. Так как в последовательности, кодирующей S участок в геноме варианта Дельта, отсутствует делеция 69/70 и мутация N501Y подъем кривых флуоресценции регистрировали по всем каналам FAM, HEX, ROX и Cy5 (рисунок 3А). Для варианта BA.1 характерно наличие делеции 69/70 и замена N501Y, следовательно, наблюдается подъем кривых флуоресценции только по каналу FAM (рисунок 3Б). В случае высокой концентрации вируса подъем кривой флуоресценции по каналу Cy5 может не регистрироваться. Для варианта BA.2 характерно отсутствие делеции 69/70 и

наличие замены N501Y, следовательно, наблюдается подъем кривых флуоресценции по каналам FAM и HEX (рисунок 3В). Образцы со значением порогового цикла амплификации более 32 либо в случае отсутствия пересечения пороговой линии по каналу FAM, считались отрицательными (рисунок 3Г).



А – B.1.617.2 (Дельта); Б – линия BA.1; В – линия BA.2; Г – отрицательный

Рисунок 3 – Кривые роста флюоресценции по каналу ROX, FAM, HEX, Cy5, соответствующие вариантам Дельта, и Омикрон (линии BA.1 и BA.2) вируса SARS-CoV-2

1.5 Определение генетического варианта вируса SARS-CoV-2 на основании данных полногеномной последовательности вируса

Для подтверждения заражения новым, ранее не циркулирующим в стране конкретным вариантом и для его описания следует используется метод полногеномного секвенирования SARS-CoV-2.

1.5.1 Экстракция РНК и амплификация библиотек генома вируса SARS-CoV-2 с последующим полногеномным секвенированием и молекуллярно-генетическим биоинформационным типированием

Выделение РНК вируса SARS-CoV-2 из мазков пациентов с подтвержденным COVID-19 производится с использованием набора реагентов, предназначенногодля выделения очищенной РНК из образца с дальнейшим получением библиотеки для полногеномного секвенирования, согласно инструкции производителя. Реакция обратной транскрипции проводится в объеме 10 мкл с высокоточной и высокопроцессивной ревертазой. Данную смесь необходимо было нагреть в следующем температурном режиме: 25°C – 2 минут, 55°C – 10 минут, 95°C – 1 минута, и дальнейшее охлаждение до 4°C.

Для проведения амплификации используется готовая реакционная смесь с высокоточной полимеразой, смесь праймеров протокола ARTIC V.4.1 (<https://github.com/artic-network/artic-ncov2019/V4.1>) в двух пулах, и полученная кДНК. Программа амплификации ПЦР: начальная денатурация при 98°C – 30 сек, 30 циклов (денатурация 98°C – 10 сек, отжиг праймеров и элонгация 63°C – 5 мин), хранение при 4°C.

Для детекции продукта амплификации для пула 1 и пула 2 необходимо произвести электрофоретическую детекцию результатов в 1,7% агарозном геле рисунок 4.

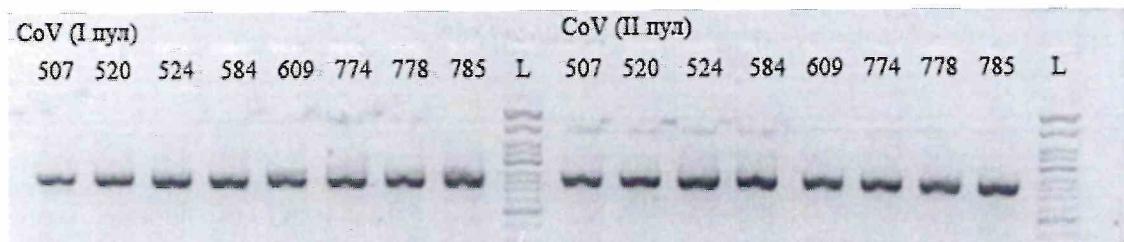


Рисунок 4 – Электрофоретическая детекция продуктов ампликонной библиотеки SARS-CoV-2 размером около 400 п.н.

1.5.2 Протокол подготовки секвенирования библиотеки SARS-CoV-2 на приборе MiSeq Illumina.

Сначала необходимо объединить ПЦР продукт из 1-го и 2-го пула каждого образца и произвести очистку на магнитных частицах согласно протоколу производителя. Образец элюировать в 26 мкл дейонизированной воды в новую пробирку для ПЦР. Измерение концентрации очищенных образцов библиотеки SARS-CoV-2 производится на флуориметре. При необходимости развести образцы в 0,1Х ТЕ буфере до концентрации 10-20 нг/мкл.

Подготовка ампликонной библиотеки происходит согласно инструкции используемого производителя и адаптационного протокола (<https://www.protocols.io/view/standard-protocol-nebnext-artic-sars-cov-2-library-ewov1421ovr2/v3>). Начинается протокол с подготовки концов ампликонов и затем следует лигирование адаптерной последовательности для прибора Illumina Miseq. Очистка ампликонов с лигированным адаптером производится с помощью магнитных частицах согласно протоколу производителя. Очищенную ампликонную библиотеку с лигированным адаптером элюируют в 7,5 мкл дейонизированной воды в новую пробирку для ПЦР.

После очистки библиотеки с лигированным адаптером необходимо присоединить с помощью ПЦР последовательности индексов используя следующие временные и температурные условия: начальная денатурация при 98°C – 30 сек, 6 циклов (денатурация 98°C – 10 сек, отжиг праймеров и элонгации 65°C – 75 сек), конечная элонгация при 65°C – 5 мин, хранение при 4°C. Полученные проиндексированные библиотеки объединяются в 1 пробирку типа «Эппendorф» по 10 мкл каждой. Из смеси библиотек отбирается 50 мкл и очищается с помощью магнитных частицах согласно протоколу производителя. Очищенная и объединенная библиотека элюируется в 15 мкл дейонизированной воды. Такая библиотека может храниться при температуре -20°C.

Измерение концентрации, очищенной спулированной библиотеки производится на флуориметре. Доводим итоговую концентрацию до 4 нМ. Для перевода концентрации из нг/мкл в нМ используется формула:

$c/(660*520)) * 1000000$, где с – концентрация в нг/мкл. После, согласно протоколу Illumina, необходимо произвести нормализацию библиотеки в 0,2М NaOH, а затем нужно развести нормализованную библиотеку в НТ1 буфере до 18рМ. Данные концентрации и разведения подобраны для запуска 96 образцов с высоким уровнем покрытия.

1.5.3 Анализ и сборка полногеномных последовательностей вируса SARS-CoV-2

Анализ полученных данных производится с использованием пайплайна для сборки попарноконцевых прочтений, секвенированных на приборе MiSeq Illumina. Протокол сборки основан на следующих утилитах и библиотеках: kromsatel.py, bowtie2, samtools, pilon-1.24, consensus-highlighter.py, bcftools. После сборки и оценки качества полногеномных последовательностей в формате fasta они загружаются на электронный ресурс <https://clades.nextstrain.org/>. Классификация генетического варианта осуществляется по классификации Pango и Всемирной организации здравоохранения с указанием данных о наличии нуклеотидных и аминокислотных замен (рисунок 5).

#	I	Sequence name	QC	Clade	Pango lineage (Nextclade)	WHO name	Mut.	Conv.	Nucleotide sequence
0	1	CoV_507	NMPCFS	20I	B.1.17	Alpha	36	99.5%	
1	2	CoV_520	NMPCFS	21J	AY.122	Delta	40	98.4%	
2	3	CoV_524	NMPCFS	21J	AY.122	Delta	40	97.1%	
3	4	CoV_584	NMPCFS	21K	BA.1.1	Omicron	55	100.0%	
4	5	CoV_609	NMPCFS	21L	BA.2	Omicron	67	96.2%	
5	6	CoV_774	NMPCFS	22B	BA5.2.1	Omicron	70	99.2%	
6	7	CoV_778	NMPCFS	22B	B.1.7	Omicron	74	95.8%	

Рисунок 5 – Результаты определения генетических вариантов для полногеномных последовательностей вируса SARS-CoV-2 исследуемых образцов с использование электронного ресурса clades.nextstrain.org

5. Заключение

Таким образом, мониторинг циркулирующих вариантов вируса SARS-CoV-2 с использованием надёжных систем мониторинга, таких как секвенирование, имеет решающее значение для общественного здравоохранения, позволяющее оперативно выявлять потенциально опасные мутации, оценивать их влияние на трансмиссивность, тяжесть заболевания и другие характеристики.

Перечень возможных ошибок, ограничений и путей их устранения

Проблемы и методические ошибки, которые могут возникать при выполнении метода с описанием причин возникновения и путей их устранения представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Возможные ошибки или осложнения при выполнении метода и пути их устраниния

Проблема	Возможная причина	Пути устранения
Отсутствие ПЦР-продуктов при электрофоретической детекции	Деградация РНК и/или низкое содержание исходной РНК	Использовать только свежие образцы биологического материала для выделения РНК.
	Деградация РНК/кДНК	Использовать пробы РНК сразу после выделения.
	Погрешности в проведении реакции амплификации	Контроль качества реагентов путём использования в реакции контрольных образцов.
	Вирусная нагрузка менее 2000 копий РНК/мл	Тестирование вирусной нагрузки до проведения амплификации.
Невозможность прочтения сиквенсов на генетическом анализаторе.	Смесь из нескольких ПЦР-продуктов в реакции секвенирования	Повторить процедуру выделения ПЦР-продуктов и реакцию секвенирования.
	Недостаточная очистка продуктов реакции секвенирования	Повторить реакцию секвенирования и провести тщательную очистку её продуктов.
При сравнении сиквенса с электронным ресурсом https://clades.nextstrain.org/ нет гомологии с известными вариантами SARS-CoV-2	Ложноположительная реакция ПЦР из-за нарушения условий проведения	Повторить процедуру амплификации с соблюдением условий и контролем реагентов.