№ держреєстрації 0120U104574
Інв. № _____

Національна академія наук України

Інститут молекулярної біології і генетики

03143, м.Київ, вул. Академіка Заболотного, 150 тел/факс (044)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Заступник директора Інституту молекулярної біології та генетики НАН України

_____ проф. д.б.н. Дзядевич С. В.

ЗВІТ

ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ

КОМБІНОВАНІ ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ТА АНАЛІЗУ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ ВРОДЖЕНОГО ІМУНІТЕТУ ПРИ ОСОБЛИВО НЕБЕЗПЕЧНИХ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЯХ

за договорами № 23/01.2020 від 21 жовтня 2020 року та №58/01/0091 від 29 квітня 2021 року

(заключний)

Науковий керівник НДР

Академік НАН України, д.б.н., проф. _____ М. А. Тукало

2021

Результати роботи розглянуто Вченою радою ІМБГ НАН України, протокол № 14 А від 7 грудня 2021 року

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, Директор ІМБГ НАН України, академік НАН України, доктор біол. наук, професор		М.А. Тукало (вступ, реферат, розділи 1-5)
Завідувач відділу, доктор біол. наук, професор		В.І. Кашуба (вступ, розділи 1, 2, 3, 5)
Головний наук. співроб, канд. біол. наук, старш. наук. співроб.		З.Ю. Ткачук (вступ, реферат, розділ 4, 5)
Провідний наук. співроб., доктор біол. наук, старший дослідник		Г.В. Геращенко (вступ, розділи 1, 2, 3, 5)
Старший наук. співроб., канд. біол. наук, с.н.с.		О.Й. Гудзера (розділ 4, 5)
Молодший наук. співроб.		Н.С. Мельнічук (розділ 4, 5)
Молодший наук. співроб.		Т.В. Марчишак (розділи 4, 5)
Молодший наук. співроб.		Р.О. Ніколаєв (розділ 4)
Провідний інженер		О.О. Нужний (розділ 4)

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ 10
ВСТУП 11
РОЗДІЛ 1. БІОІНФОРМАТИВНИЙ АНАЛІЗ НУКЛЕОТИДНОЇ ПОСЛІДОВНОСТІ ГЕНОМІВ НИЗКИ ПОШИРЕНИХ В СВІТІ ШТАМІВ ВІРУСУ SARS-COV-2 ТА ІНШИХ ВІДІБРАНИХ ВІРУСІВ 15
1.1. Біоінформативний аналіз штамів вірусу SARS-CoV-2 15
1.2. Біоінформативний аналіз геномів низки поширених в світі штамів вірусів, дизайн та синтез праймерів для кПЛР та комбінованих тест-систем 17
1.3. Біоінформативний аналіз експресії генів уродженого імунітету для створення комбінованої тест-системи, дизайн та синтез праймерів для кПЛР .. 22
РОЗДІЛ 2. ЗБІР БІОЛОГІЧНИХ РІДИН ЗДОРОВИХ ТА ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРИХ ТА СТВОРЕННЯ КОЛЕКЦІЙ ДНК ТА РНК 32
2.1. Забір зразків біологічних рідин 32
2.2. Створення колекцій зразків РНК та кДНК із зразків цільної крові від здорових волонтерів та пацієнтів з гострою формою COVID-19 33
2.3. Виділення тотальної РНК 33
2.4. Перевірка якості РНК 34
2.5. Синтез кДНК 34
2.6. Створення колекції кДНК із зразків назо-орофарингеального зішкрібу від здорових та пацієнтів з гострою формою COVID-19 38
РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ ТА ПІДБІР МОЛЕКУЛЯРНИХ МЕТОДІВ СТВОРЕННЯ ДІАГНОСТИКУМІВ 42
РОЗДІЛ 4. НАПРАЦЮВАННЯ РЕКОМБІНАНТНОГО ФЕРМЕНТУ BST ДНК-ПОЛІМЕРАЗИ ДЛЯ СТВОРЕННЯ ЕКСПРЕС ТЕСТ-СИСТЕМИ НА ОСНОВІ ІЗОТЕРМІЧНОЇ ПЛР 46
РОЗДІЛ 5. РОЗРОБКА ТЕСТ-СИСТЕМ ТА АНАЛІЗ РЕЗУЛЬТАТІВ ТЕСТІВ НА ВИЗНАЧЕННЯ ВІРУСНИХ ПАТОГЕНІВ 48

5.1. Перевірка роботи праймерів, ферментів, їх співвідношення, методів підготовки зразків та оптимізація роботи ізотермічної ПЛР, ПЛР систем з флуоресцентною детекцією для визначення SARS-CoV-2 48
5.2. Розробка ПЛР тестів з хроматографічною детекцією продуктів для визначення SARS-CoV-2 55
5.3. Створення комбінованої тест-системи для визначення вірусів SARS-CoV-2 й грипу А та Б 57
5.4. Створення комбінованої тест-системи для визначення респіраторних вірусів 59
РОЗДІЛ 6. ПРОВЕДЕННЯ ДІАГНОСТИКИ НА ДОСТАТНІХ КЛІНІЧНИХ ВИБІРКАХ ТА ОТРИМАННЯ СТАТИСТИЧНО ЗНАЧУЩИХ РЕЗУЛЬТАТІВ ДЛЯ РОЗРОБКИ ТЕСТ-СИСТЕМ ТА ЇХ ВАЛІДАЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯМ ПОДВІЙНОГО СЛІПОГО МЕТОДУ 61
6.1. Валідація тест-систем на «невідомих» зразках для встановлення специфічності та чутливості тесту (додатковий набір біологічних зразків) та встановлення наявності вірусу SARS-CoV-2 методом ПЛР з хроматографічною детекцією. 61
6.2. Підтвердження результатів аналізу штамів вірусу SARS-CoV-2 кПЛР..... 63
РОЗДІЛ 7. ВИЗНАЧЕННЯ НУКЛЕОТИДНОЇ ПОСЛІДОВНОСТІ ГЕНОМІВ ШТАМІВ ВІРУСУ SARS-COV-2 ПОШИРЕНИХ В УКРАЇНІ .. 65
7.1. Підготовка зразків та відпрацювання умов для постановки секвенування нового покоління 65
7.2. Скринінг зразків хворих на наявність вірусів та визначення нуклеотидної послідовності геномів низки поширених в Україні штамів вірусу SARS-CoV-2 у лютому-червні 2021 року 67
7.3. Скринінг зразків хворих на наявність вірусів та визначення геномів низки штамів вірусу SARS-CoV-2 поширених в Україні у липні – жовтні 2021 року . 75
РОЗДІЛ 8. ВСТАНОВЛЕННЯ РІВНІВ ВІДНОСНОЇ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ ІМУННОЇ СИСТЕМИ У ЗДОРОВИХ ДОНОРІВ ТА ХВОРИХ НА

ОСОБЛИВО НЕБЕЗПЕЧНІ ВІРУСНІ ЗАХВОРЮВАННЯ ДЛЯ РОЗРОБКИ КОМБІНОВАНОЇ ТЕСТ-СИСТЕМИ 83
8.1. Встановлення рівнів відносної експресії генів імунної системи у здорових донорів 83
8.2. Встановлення рівнів відносної експресії генів імунної системи у хворих на особливо небезпечні вірусні захворювання 95
8.3. Статистичний аналіз результатів визначення рівнів відносної експресії генів у групі здорових донорів та хворих для розробки комбінованої експресійної тест-системи. 108
8.4. Біоінформатичний аналіз результатів (MDR аналіз) визначення рівнів відносної експресії генів у групі здорових донорів та хворих та детекція генів маркерів для комбінованої екпрсесійної тест-системи 113
8.5. Інтерпретація тестування експресійної тест-системи. 120
РОЗДІЛ 9. ЗБІР ПЛР ТА КОМБІНОВАНИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ВІРУСНИХ ПАТОГЕНІВ ТА ЕКСПРЕСІЙНОЇ СИСТЕМИ (УЗАГАЛЬНЕННЯ УСІХ РЕЗУЛЬТАТІВ) ТА РОЗРОБКА ПРОТОКОЛІВ 121
9.1. Порівняння ПЛР та комплексних тест-систем для визначення SARS-CoV-2 та інших респіраторних вірусів. 121
9.2. Розробка протоколів для проведення детекції вірусу SARS-CoV-2 та комбінованих тестів для визначення вірусних патогенів. 124
9.3. Розробка протоколів для проведення аналізу експресії генів за допомогою комбінованої експресійної тест-системи 129
ВИСНОВКИ 131
ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ 133

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 139 с., 9 розд, 60 рис., 12 табл, бібліогр. 72.

Ключові слова: КОМБІНОВАНІ ТЕСТ-СИСТЕМИ, кПЛР ТЕСТ СИСТЕМА, РЕСПІРАТОРНІ ВІРУСИ, ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ, ІМУННА СИСТЕМА, ПОВНОГЕНОМНЕ ГЕНОТИПУВАННЯ, СЕКВЕНУВАННЯ НОВОГО ПОКОЛІННЯ, SARS-CoV-2, КОІНФЕКЦІЇ.

Мета роботи: Створення ПЛР тест систем для детекції вірусів та комбінованих тест-систем для аналізу експресії генів уродженого імунітету як засобів ефективної діагностики особливо небезпечних вірусних інфекцій (ОНВІ) й конфекцій та скринінг штамів вірусу SARS-CoV-2 поширених в Україні.

У результаті виконання роботи, проведено аналіз нуклеотидної послідовності геномів низки штамів вірусу SARS-CoV-2, грипу та інших особливо небезпечних вірусів. Виконано біоінформативний аналіз вивчених геномів та проведено дизайн праймерів для створення комбінованих тест-систем на основі ізотермічного та кПЛР аналізів. Підібрано специфічні олігонуклеотиди для кПЛР аналізу патогенних вірусів та експресії генів імунної системи людини для дослідження, створення та відпрацювання ПЛР та комбінованих тест-систем. Налагоджено збір біологічних рідин здорових та інфекційних хворих та створено колекції РНК та кДНК. Відпрацьовано методики отримання РНК з орофарингеальних зішкрібів для прямої детекції експресії генів для кПЛР аналізу та з використанням ізотермічної полімерази Bst 3.0. Клоновано, експресовано в клітинах бактерій та напрацьовано рекомбінантний фермент Bst ДНК-полімеразу для створення експрес тест-системи на основі ізотермічної ПЛР.

Учасниками проєкту проведено відпрацювання умов та складу реакційних сумішей для постановки різних варіантів кПЛР для визначення SARS-CoV-2 у біологічних рідинах на основі одиничної детекції та комбінованих тест-систем. Відпрацьовано низку варіантів тестів для визначення вірусу SARS-CoV-2 та інших респіраторних вірусів на основі ПЛР та кПЛР для отримання

комбінованих тест-систем. Доведено високу ефективність та специфічність запропонованих тестів на вибірках зразків.

Відпрацьовані умови та поставлено метод секвенування нового покоління для повногеномного генотипування вірусу SARS-CoV-2 у хворих на COVID-19 в Україні. Вперше в Україні за допомогою повногеномного генотипування виявлено два нові небезпечні варіанти вірусу SARS-CoV-2 - Альфа варіант (B.1.1.7) – у лютому 2021 року та Дельта варіант (B.1.617.2) – у червні 2021 року. Обидва випадки допомогли своєчасно інформувати український уряд, МОЗ та суспільство задля своєчасного адекватного реагування та проведення протиепідемічних заходів. Загалом проаналізовано 234 зразки РНК вірусу SARS-CoV-2 з 20 регіонів України.

Проведено збір зразків та створено колекції РНК зі зразків крові здоворих донорів та хворих на COVID-19. Відпрацьовано умови проведення кПЛР аналізу та встановлено рівні відносної експресії десяти генів вродженого імунітету 59 здорових донорів та 52 хворих на гостру форму COVID-19 для створення комбінованої експресійної тест-системи, зокрема *MX1, OAS1, RNASEL, EIE2AK2, IL8, IL6, TNFα, IL10, CD4, F5*. Для 8 з них знайдено значущі різниці рівнів відносної експресії між контрольною групою та хворими на COVID-19. Завдяки проведеному статистичному та біоінформатичному аналізу запропоновано експресійні набори біомаркерів з 3-8 генів, які дозволяють діагностування гіперзапалення, гіперкоагуляцію та лімфопенію у периферичних клітинах крові пацієнтів з COVID-19 з високими показниками чутливості, специфічності та точності для розробки комбінованої експресійної тест-системи. Найвищі показники чутливості, специфічності та точності виявлено для комбінації трьох експресійних біомаркерів: *F5, MX1, CD4* (Ac.0,9; Se.0,92; Sp.0,88), тоді як найвищий показник прогностичної цінності набору біомаркерів (OR) має комбінація з 6-и генів: *F5, MX1, RNASEL, CD4, IL10, EIF2AK2* (OR=134,37). Для запропонованих комбінованих ПЛР тестів для визначення вірусних патогенів та експресійної системи розроблено протоколи для проведення аналізів.

SUMMARY

Research report: 139 pages, 9 chapters, 60 figures, 12 tables, 72 bibliographies.

Keywords: COMBINED TEST SYSTEMS, qPCR TEST SYSTEMS, RESPIRATORY VIRUSES, GENE EXPRESSION, IMMUNE SYSTEM, GENOME-WIDE GENOTYPING, NEXT-GENERATION SEQUENCING, SARS-CoV-2, CO-INFECTIONS.

The key of the project: Creation of PCR test systems for virus detection and combined test systems for analysis of innate immune gene expression as a means of effective diagnosis of highly dangerous viral infections (HDVI) and co-infections and screening of SARS-CoV-2 virus strains common in Ukraine.

It's been made the analysis of sequence of genome nucleotide of series SARS-CoV-2 virus strains, Influenza and other highly dangerous viral infections as the project result. It's been made the bioinformatic analysis of studied genomes and it's been carried out the design of primers for creation of combined test systems based on isothermal and qPCR analysis. It's been selected the specific oligonucleotides for qPCR analysis of pathogenic viruses and for human immune system gene expression in order to research, create, test PCR and combined test systems. It's been adjusted the collection of biological liquids of healthy and infectious patients and it's been created the collection of RNA and cDNA. It's been tested methods of getting RNA from the oropharyngeal swabs for the detection of gene expression for qPCR and also using isothermal polymerase Bst 3.0. It's been cloned, expressed (in bacterial cells) and isolated the recombinant enzyme Bst of DNA-polymerase in order to create express test system that is based on isothermal PCR.

Members of project have tested the conditions and composition of the reaction mixtures for the setting up of different kinds of qPCR for determining SARS-CoV-2 in biological liquids on the base of only virus detection and combined test systems. It's been tested the variety of tests for the determining of SARS-CoV-2 and other respiratory viruses based on PCR and qPCR in order to get combined test systems. It's been proved the high efficiency and specificity of the proposed tests on samples.

It’s been appraised the conditions and set up the next-generation sequencing method for genome-wide genotyping of SARS-CoV-2 in patients with COVID-19 in Ukraine.

It was firstly determined two new dangerous kinds of SARS-CoV-2 by the usage of genome-wide genotyping, first- Alpha variant (B.1.1.7) in 2021, February and second- Delta variant (B.1.617.2) in 2021, June. Both cases helped to inform the Ukrainian government, the Ukrainian Ministry of Health and the society in order to response appropriately and to carry out anti-epidemic measures. At least, it’s been analised 234 samples of RNA SARS-CoV-2 from 20 regions of Ukraine.

It’s been collected the samples and created clusters of RNA from the blood specimens of healthy donors and patients with COVID-19. It’s been tested the conditions of qPCR analyses and established the level of relative expression of 10 genes of innate immunity on 59 healthy donors and 52 patients with acute form of COVID-19 in order to bring on the combined expression test system, for example, MX1, OAS1, RNASEL, EIE2AK2, IL8, IL6, TNFα, IL10, CD4, F5. It’s been found the significant difference in levels of relative expression between control group and patients with COVID-19.

Statistic and bioinformatics analysis lead to the suggestion of biomarker expression sets with high levels of sensitivity, specificity, accuracy which consist of 3-8 genes and allow to diagnose the hyper inflammation, hyper coagulation, lymphopenia in the peripheral blood cells in the patients with COVID-19, and making the combined expression test system. It’s been demonstrated the highest levels of sensitivity, specificity, accuracy at the combination of three expression biomarkers: F5, MX1, CD4 (Ac.0,9; Se.0,92; Sp.0,88), meanwhile the best mark of prognostic value belongs to the set of biomarkers (OR) that consists of 6 genes: F5, MX1, RNASEL, CD4, IL10, EIF2AK2 (OR=134,37). It’s been developed the protocols for mentioned above combined PCR tests for determining of viral pathogens and expression system.

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ГРВІ – гостра респіраторна вірусна інфекція

ДНК- дезоксирибонуклеїнова кислота

кДНК- компліментарна ДНК

кПЛР – кількісна полімеразно-ланцюгова реакція

ОНВІ - особливо небезпечні вірусні інфекції

ПЛР – полімеразно-ланцюгова реакція

РНК- рибонуклеїнова кислота

УІ - уроджений імунітет

ВСТУП

Біологічна безпека у державі підтримується завдяки комплексу заходів, що спрямовані на своєчасне виявлення, моніторинг перебігу, оцінку захворюваності на особливо небезпечні вірусні інфекції (ОНВІ) та стану здоров'я громадян, які можна визначити за допомогою молекулярно-біологічних підходів. Серед молекулярно-біологічних методів найбільш відомими є методи полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), які дозволяють виявити вірус навіть тоді, коли його концентрація мізерно мала – тобто на самих ранніх стадіях захворювання. Більшість ПЛР тестів для виявлення ОНВІ в Україні є іноземного походження, досить дорогі та потребують висококваліфікованих спеціалістів і коштовного обладнання. Крім того, тести на основі кількісної ПЛР (кПЛР) для визначення ДНК- і РНК-вмісних вірусів та експресії генів є багатоступеневими технологіями і потребують значну кількість реагентів та витратних матеріалів іноземного виробництва. В той же час ці технології вважаються найбільш достовірними та оголошені ВООЗ як «золотий стандарт» діагностики. Окрім інфекційних загроз на сьогодні людство стикається з новими викликами, які пов'язані з успіхами науково-технічного прогресу. На жаль, поки що не напрацьовано єдиного рішення на міжнародному рівні по управлінню такими ризиками, тому контроль за біологічними загрозами на національному рівні грає надзвичайно критичну роль. Нехтування цими факторами ставить під загрозу національну безпеку держави, особливо під час спалахів ОНВІ.

Боротьба з пандемією COVID-19 засвідчила, що для мінімізації негативних наслідків поширення інфекції в Україні, зменшення летальних випадків і подальшого відновлення економіки країни потрібно проводити широке тестування населення та ізоляцію інфікованих пацієнтів. Тільки в семи країнах світу виготовляють власні ПЛР тест-системи на основі мічених Taq-Man проб. Зараз розроблені більш дешеві ПЛР діагностики на основі інтеркалюючих SYBR Green барвників, LAMP технологій (ізотермічна петльова ампліфікація) та ін. [1, 2]. Кожен з них має свої переваги та недоліки.

Тести на основі кількісної ПЛР (кПЛР) для визначення ДНК- і РНК-вмісних вірусів та експресії генів є багатоступеневими технологіями і потребують значну кількість реагентів та витратних матеріалів іноземного виробництва. В той же час ці технології вважаються найбільш достовірними та оголошені ВООЗ як «золотий стандарт» діагностики. Окрім інфекційних загроз на сьогодні людство стикається з новими викликами, які пов'язані з успіхами науково-технічного прогресу. На жаль, поки що не напрацьовано єдиного рішення на міжнародному рівні по управлінню такими ризиками, тому контроль за біологічними загрозами на національному рівні грає надзвичайно критичну роль. Нехтування цими факторами ставить під загрозу національну безпеку держави, особливо під час спалахів ОНВІ.

Боротьба з пандемією COVID-19 засвідчила, що для мінімізації негативних наслідків поширення інфекції в Україні, зменшення летальних випадків і подальшого відновлення економіки країни потрібно проводити широке тестування населення та ізоляцію інфікованих пацієнтів. Тільки в семи країнах світу виготовляють власні ПЛР тест-системи на основі мічених Taq-Man проб. Зараз розроблені більш дешеві ПЛР діагностики на основі інтеркалюючих SYBR Green барвників, LAMP технологій (ізотермічна петльова ампліфікація) та ін. [1, 2]. Кожен з них має свої переваги та недоліки та потребує доопрацювання згідно з новими викликами часу.

Однак для точної діагностики штаму коронавірусу єдиний спосіб це встановити – є проведення повногеномного генотипування вірусу одним з сучасних методів секвенування. Відомо, що SARS-CoV-2 викликає важкий гострий респіраторний синдром коронавірус-2, досить швидко набуває більш вірулентних та інфекційних властивостей у популяції людини [1, 2]. Ці особливості обумовлені насамперед тим, що SARS-CoV-2, будучи позитивно ланцюговою РНК-бетакоронавірусом, має високий рівень пластичності геному за відсутності ефективних механізмів виправлення помилок реплікації. Іншими словами, раптові спалахи пандемії COVID-19 в основному викликані мутованими варіантами SARS-CoV-2. Нові мутації можуть призвести до

атипових, більш агресивних клінічних проявів COVID-19, які вплинуть на групи людей, які раніше не були в групі високого ризику, такі як молодь та діти [3]. Крім того, поява нових варіантів SARS-CoV-2 вимагає корекції обох протоколів лікування пацієнтів та перевірки ефективності противірусних препаратів та вакцин [4, 5].

З початку пандемії у всьому світі активно розробляються стратегії генетичного моніторингу мутацій коронавірусу, щоб своєчасно реагувати на появу нових агресивних штамів. Україна, будучи однією з найбільших країн Центральної Європи з високою мобільністю населення, знаходиться в зоні високого епідеміологічного ризику пандемій нових високо патогенних варіантів коронавірусу. Так з середини жовтня 2021 року «британський штам» (лінія B.1.1.7) був домінуючим у сусідніх країнах, що спричинило третій спалах COVID-19 в Європі та з лютого-березня 2021 року нову хвилю пандемії в Україні. Слід відмітити, що у липні 2021 в Україні зареєстровано новий патогенний варіант SARS-CoV-2, який вже спричинив нову хвилю пандемії у багатьох країнах світу та може спричинити її в Україні.

Часто зараження пацієнта одним збудником в організмі викликає швидке інфікування іншим. Ці множинні інфекції, або коінфекції дуже ускладнюють лікування, оскільки вони, як правило, протікають клінічно значно важче у порівнянні з моноінфекціями та викликають додаткові ускладнення. Коінфекції також формують вірулентність патогенів, що може мати прямий вплив на розвиток патологічного процесу в організмі людини. Такий розвиток подій особливо небезпечний зараз при пандемії COVID-19, для якої вже встановлено низка випадків коінфекції віруса SARS-CoV2 та віруса грипу [3]. Модельні розрахунки теперішньої пандемії свідчать про велику загрозу ймовірної коінфекції віруса SARS-CoV2 і епідемічниих штамів грипу, кору і інш. Тому створення тест-систем, які зможуть одночасно ідентифікувати декілька вірусів чинників таких коінфекцій є дуже актуальним.

Уроджений (неспецифічний, спадковий) імунітет людини (УІ) – це генетично обумовлена здатність організму протидіяти «чужим» за поверхневими

антигенами агентів (мікроорганізми, трансплантати, токсини, онкологічні клітини, віруси), яка існує ще до першої появи їх в організмі [9, 10, 11]. Здоровий уроджений імунний захист організму контролює своєчасне виявлення та знищення цих факторів, зокрема власних мутантних клітин з онкологічними властивостями [12]. За вроджений імунітет відповідає низка генів, зміна активності яких запускає або гальмує каскад реакцій імунного захисту. У кожного індивіда експресія цих генів має особливості, що визначає індивідуальні особливості вродженої імунної відповіді та здатності ефективно протидіяти екзогенним факторам та раку. Певні особливості УІ, які можуть бути ідентифіковані на рівні змін експресії генів, є маркерами патологічного процесу (онкологічного або/та інфекційного захворювання) [13, 14]. З іншого боку генетично обумовлене ослаблення УІ збільшує ризик появи таких захворювань в майбутньому.

Враховуючи стрімке поширення загрозливих для життя та здоров’я людини захворювань, зокрема онкопатологій, хронічних та гострих інфекційних захворювань, та зниження ефективності їх терапії [13], встановлення індивідуальних особливостей стану УІ пацієнта, зокрема в процесі лікування, є нагальною потребою прогнозування та розробки підходів персоніфікованої медицини.

Нами використано новітній біотехнологічний підхід для аналізу рівнів відносної експресії відібраних генів на основі кількісної ПЛР у реальному часі, який дозволяє швидко оцінювати активність УІ при різних патологіях. Цей підхід є гнучким та універсальним, оскільки дозволяє швидко змінювати та доповнювати перелік досліджуваних генів в діагностичному наборі, в залежності від мети дослідження та нагальних потреб.

РОЗДІЛ 1. БІОІНФОРМАТИВНИЙ АНАЛІЗ НУКЛЕОТИДНОЇ ПОСЛІДОВНОСТІ ГЕНОМІВ НИЗКИ ПОШИРЕНИХ В СВІТІ ШТАМІВ ВІРУСУ SARS-COV-2 ТА ІНШИХ ВІДІБРАНИХ ВІРУСІВ

Біоінформативний аналіз геномів вірусу SARS-CoV-2 було проведено за допомогою відкритої бази даних NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sars-cov-2/). Порівняльний аналіз геномних послідовностей вірусів виконано за допомогою ресурсу BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

1.1. Біоінформативний аналіз штамів вірусу SARS-CoV-2

Згідно даних Gene Bank було проаналізовано наступні послідовності (Таблиця 1), анотовані на цьому ресурсі.

Таблиця 1

Коронавірусні сіквенси, анотовані у Gene Bank

Accession	Gene Region	Collection Date	Locality
MN908947	complete	Dec-2019	China
MN970003	RdRP	08-Jan-2020	Thailand
MN970004	RdRP	13-Jan-2020	Thailand
MN938384	complete	Jan-2020	China: Shenzhen
MN938385	RdRP	Jan-2020	China: Shenzhen
MN938386	RdRP	Jan-2020	China: Shenzhen
MN938387	S	Jan-2020	China: Shenzhen

Accession	Gene Region	Collection Date	Locality
MN938388	S	Jan-2020	China: Shenzhen
MN938389	S	Jan-2020	China: Shenzhen
MN938390	S	Jan-2020	China: Shenzhen
MN975262	complete	Jan-2020	China
MN975263	RdRP	Jan-2020	China
MN975264	RdRP	Jan-2020	China
MN975265	RdRP	Jan-2020	China
MN975266	S	Jan-2020	China
MN975267	S	Jan-2020	China
MN975268	S	Jan-2020	China
MN985325	complete	19-Jan-2020	USA: WA
MN988713	complete	21-Jan-2020	USA: IL

Згідно аналізу найбільш специфічні ділянки, що властиві коронавірсусам знаходяться у N білку. Ці дані використані нами для підбору специфічних праймерів для розробки тест-систем (Рисунок 1).

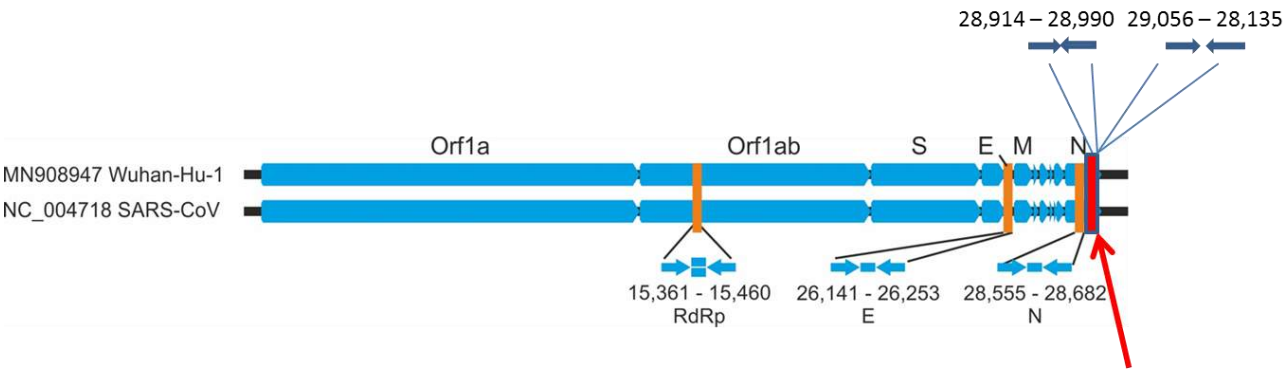


Рисунок 1. Схема розташування праймерів для кПЛР у порівнянні з німецькою тест-системою [Corman V. et al].

1.2. Біоінформативний аналіз геномів низки поширених в світі штамів вірусів, дизайн та синтез праймерів для кПЛР та комбінованих тест-систем

Згідно даних Центру громадського здоров'я МОЗ України найбільша інфекційна захворюваність населення по Україні за 9 місяців 2019 та 2020 року зареєстрована для гострих респіраторних вірусних інфекцій (ГРВІ) складає: 9 міс 2020 – 3626281 (8637,3 на 100 тис. населення), 9 міс 2019 (по вересень) – 4112577 (9741,5 на 100 тис. населення) https://phc.org.ua/kontrol-zakhvoryuvan/inshi-infekciyni-zakhvoryuvannya/monitoring-i-ocinka/infekciyna-zakhvoryuvanist-naselennya-ukraini

Ці захворювання викликаються низкою небезпечних вірусів, враховуючи високу захворюваність населення на грип та COVID-19. Згідно цих даних було відібрано низку вірусів для комплексного аналізу. Серед них віруси епідемічного грипу (А та Б), вірусів парагрипу 1-3 (Parainfluenza viruses 1-3), респіраторно-синцитіальних вірусів А і В та ортопневмовірусів людини (Orthopneumovirus A2, B1), риновірусів (Rhinovirus A (3D), вірус кіру (Measles virus D8, B3).

Нами проаналізовано їх нуклеотидні послідовності, відібрано найбільш консервативні регіони для цих штамів вірусів та підібрано специфічні праймери для розробки ПЛР діагностикумів.

SARS-Cov-2 консервативний регіон (N-білок)

```
Query  122    AAAGGCCAACAACAACAAGGCCAAACTGTCACTAAGAAATCTGCTGCTGAGGCTTCTAAG  181
              |||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||
```

```
Sbjct  28887  AAAGGCCAACAACAACAGGGCCAAACTGTCACTAAGAAATCTGCTGCTGAGGCATCTAAA  28946

Query  182    AAGCCTC**GGCAAAAACGTACTGCCACT**A**AAGCA-TACAATGTAACACAAGCTTTC**GGCAG  240
               |||||||| ||||||||||||||| || ||| || ||||| || || ||||| || || ||
Sbjct  28947  AAGCCTCGCCAAAAACGTACTGCTACAAAA-CAGTACAACGTCACTCAAGCATTTGGGAG  29005

Query  241    ACGTGGTCCAGAACAAACCCAAGGAAAT**TTTGGGGACCAGGAACTAATC**AGACAAGGAAC  300
               |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||| ||||||||||||||||
Sbjct  29006  ACGTGGTCCAGAACAAACCCAAGGAAATTTTGGGGACCAAGAATTAATCAGACAAGGAAC  29065

Query  301    TGATTACAAACATTGGCCGCAAATTGCACAATTTGCCCCCAGCGCTTCAGCGTTCTTCGG  360
               |||||||||||||||||||||||||||||||||||| || || || || || ||||| ||
Sbjct  29066  TGATTACAAACATTGGCCGCAAATTGCACAATTTGCTCCAAGTGCCTCTGCATTCTTTGG  29125

Query  361    AATGTCGCGCATTGGCATGGAAGTCACACCTTCGGGAACGTGGTTGACCTA-CACAGGTG  419
               |||||| |||||||||||||||||||||||||||||| ||| |||| || ||  || |
Sbjct  29126  AATGTCACGCATTGGCATGGAAGTCACACCTTCGGGAACATGGCTGACTTATCAT-GGAG  29184

Query  420    CCATCAAATTGGATGACAAAGATCCAAATTTCAAAGATCAAGTCATTTTGCTGAATAAGC  479
               |||| |||||||||||||||||| | ||||||||| | |||||  ||||||||||||
Sbjct  29185  CCATTAAATTGGATGACAAAGATCCACAATTCAAAGATAACGTCATACTGCTGAATAAGC  29244
```

Для вірусу грипу А, В консервативний регіон

H1N1

```
Query  1047  ATTCAATCCAGAGGACTTTTTGGGGCAATTGCAGGATTCATTGAAGGAGGATGGACAGGA  1106
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1021  ATTCAATCCAGAGGACTTTTTGGGGCAATTGCAGGATTCATTGAAGGAGGATGGACAGGA  1080

Query  1107  ATGATAGATGGATGGTATGGATACCATCATCAAAATGAGCAGGGATCTGGTTACGCAGCA  1166
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1081  ATGATAGATGGATGGTATGGATACCATCATCAAAATGAGCAGGGATCTGGTTACGCAGCA  1140

Query  1167  GATCAGAAAAGTACACAAATCGCAATTGATGGGATCAACAACAAAGTAAACTCAGTAATT  1226
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1141  GATCAGAAAAGTACACAAATCGCAATTGATGGGATCAACAACAAAGTAAACTCAGTAATT  1200

Query  1227  GAAAAAATGAACATTCAATTTACTTCAGTGGGCAAAGAGTTCAATAATCTAGAGAAAAGG  1286
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1201  GAAAAAATGAACATTCAATTTACTTCAGTGGGCAAAGAGTTCAATAATCTAGAGAAAAGG  1260
```

H3N2

```
Query  782   AATAGTAAAACCGGGAGACATACTTTTGATTAACAGCACAGGGAATCTAATTGCTCCTCG  841
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  781   AATAGTAAAACCGGGAGACATACTTTTGATTAACAGCACAGGGAATCTAATTGCTCCTCG  840

Query  842   GGGTTACTTCAAAATACGAAGTGGGAAAAGCTCAATAATGAGATCAGATGCACCCATTGG  901
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  841   GGGTTACTTCAAAATACGAAGTGGGAAAAGCTCAATAATGAGATCAGATGCACCCATTGG  900

Query  902   CAAATGCAATTCTGAATGCATCACTCCAAATGGAAGCATTCCCAATGACAAACCATTTCA  961
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  901   CAAATGCAATTCTGAATGCATCACTCCAAATGGAAGCATTCCCAATGACAAACCATTTCA  960

Query  962   AAATGTAAACAGGATCACATATGGGGCCTGTCCCAGATATGTTAAGCAAAACACTCTGAA  1021
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  961   AAATGTAAACAGGATCACATATGGGGCCTGTCCCAGATATGTTAAGCAAAACACTCTGAA  1020

Query  1022  ATTGGCAACAGGGATGCGAAATGTACCAGAGAAACAAACTAGAGGCATATTTGGCGCAAT  1081
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1021  ATTGGCAACAGGGATGCGAAATGTACCAGAGAAACAAACTAGAGGCATATTTGGCGCAAT  1080
```

Для вірусів парагрипу 1-3 консервативні регіони:

HPIV1

```
Query  1     GTAAGTTTTGTAGATCAGAGGGAAATAACCCTATGTATACTTGGTTCTATCTTCCTGACA  60
             |||||||||| |||||||| || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
```

```
Sbjct  12223  GTAAGTTTTGCAGATCAGAAGGGAATAACCCTATGTATACTTGGTTCTATCTTCCTGACA  12282

Query  61     ACATCGACTTAGATACACTTAGCAATGGAAGTCCTGCCATACGTATCCCTTATTTTGGTT  120
               | ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  12283  ATATCGATTTAGATACACTTAGCAATGGAAGTCCTGCCATACGTATCCCTTATTTTGGTT  12342

Query  121    CTGCTACTGATGAAAGATCAGAGGCTCAACTAGGTTATGTTAAGAACTTAAGCAAGCCGG  180
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  12343  CTGCTACTGATGAAAGATCAGAGGCTCAACTAGGTTATGTTAAGAACTTAAGCAAGCCGG  12402

Query  181    CAAAAGCAGCAATAAGAATCGCAATGGTTTATACTTGGGCTTATGGAACCGATGAAATAT  240
               |||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct  12403  CAAAAGCAGCAATAAGAATCGCAATGGTTTACACTTGGGCTTATGGAACTGATGAAATAT  12462

Query  241    CATGGATGGAAGCAGCACTTATAGCTCAAACTAGGGCTAACTTAAGTTTAGAGAATTTGA  300
               |||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||
Sbjct  12463  CATGGATGGAAGCAGCACTTATAGCTCAAACTAGGGCCAACTTAAGTTTAGAGAATTTGA  12522
```

HPIV2

```
Query  5995   TTTGGTGCTTCTTTGACCGGATCCATCTAATACGTAGTAGCTATTCTGATCCTCACAGTC  6054
              |||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
Sbjct  14703  TTTGGTGCTTTTTTGACCGGATCCATCTAATACGTAGTAGTTATTCTGATCCTCACAGTC  14762

Query  6055   ATGAGGTTTATCTTGTATGTAGACTTGCCGCAGATTTTAGAACTATCGGTTTCAGTGCAG  6114
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14763  ATGAGGTTTATCTTGTATGTAGACTTGCCGCAGATTTTAGAACTATCGGTTTCAGTGCAG  14822

Query  6115   CTCTAGTAACTGCTACTACTCTTCACAATGACGGATTCACAACAATACATCCTGATGTTG  6174
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||
Sbjct  14823  CTCTAGTAACTGCTACTACTCTTCACAATGACGGATTCACAACAATACATCCCGATGTTG  14882

Query  6175   TTTGTAGTTATTGGCAACACCATCTTGAAAATGTTGGGAGAGTCGGAAAAGTAATTGATG  6234
              |||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14883  TTTGTAATTATTGGCAACACCATCTTGAAAATGTTGGGAGAGTCGGAAAAGTAATTGATG  14942

Query  6235   AGATACTTGATGGTTTAGCCACCAACTTCTTCGCAGGAGATAATGGGCTTATTCTAAGAT  6294
              |||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14943  AGATACTTGATGGTTTAGCCACCAACTTCTTTGCAGGAGATAATGGGCTTATTCTAAGAT  15002
```

HPIV3

```
Query  3481   CACCTGACCCATTAGAATTATTATCTGGGGTGGTAATAACAGGATCAGAACATTGTAAAA  3540
              |||||||||||||||||| |||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  12049  CACCTGACCCATTAGAATTGTTATCTGGGGTAGTAATAACAGGATCAGAACATTGTAAAA  12108

Query  3541   TATGTTATTCTTCAGATGGCACAAACCCATATACTTGGATGTATTTACCGGGTAATATCA  3600
              |||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||| ||||| |
Sbjct  12109  TATGTTATTCTTCAGATGGTACAAACCCATATACTTGGATGTATTTACCGGGCAATATTA  12168

Query  3601   AAATAGGGTCAGCAGAAACAGGTGTGTCATCATTAAGAGTTCCTTATTTTGGATCAGTCA  3660
              ||||||| ||||||||||||||| | ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  12169  AAATAGGATCAGCAGAAACAGGTATATCATCATTAAGAGTTCCTTATTTTGGATCAGTCA  12228

Query  3661   CTGATGAAAGATCTGAGGCACAATTAGGATATATCAAGAATCTTAGTAAACCTGCAAAAG  3720
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  12229  CTGATGAAAGATCTGAGGCACAATTAGGATATATCAAGAATCTTAGTAAACCTGCAAAAG  12288

Query  3721   CCGCAATAAGAATAGCAATGATATATACATGGGCATTTGGTAATGATGAGATATCTTGGA  3780
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  12289  CCGCAATAAGAATAGCAATGATATATACATGGGCATTTGGTAATGATGAGATATCTTGGA  12348

Query  3781   TGGAAGCCTCACAGATAGCACAAACACGTGCAAATTTTACACTAGATAGTCTCAAAATTT  3840
              |||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||| ||| ||||||
Sbjct  12349  TGGAAGCCTCACAAATAGCACAAACACGTGCAAATTTTACACTAGATAATCTTAAAATTC  12408
```

Консервативні регіони для Ортопневмовірусів А2 та В1:

HRSVa

```
Query  6065   ACAATAGGTCCTGCGAATATATTCCCAGTATTTAATGTAGTACAAAATGCTAAATTGATA  6124
              |||||||||||||| ||| | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14447  ACAATAGGTCCTGCAAATGTGTTCCCAGTATTTAATGTAGTACAAAATGCTAAATTGATA  14506
```

```
Query  6125   CTATCAAGAACCAAAAATTTCATCATGCCTAAGAAAGCTGATAAAGAGTCTATTGATGCA  6184
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14507  CTATCAAGAACCAAAAATTTCATCATGCCTAAGAAGGCTGATAAAGAGTCTATTGATGCA  14566

Query  6185   AATATTAAAAGTTTGATACCCTTTCTTTGTTACCCTATAACaaaaaaaGGAATTAATACT  6244
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14567  AATATTAAAAGTTTGATACCCTTTCTTTGTTACCCTATAACAAAAAAAGGAATTAATACT  14626

Query  6245   GCATTGTCAAAACTAAAGAGTGTTGTTAGTGGAGATATACTATCATATTCTATAGCTGGA  6304
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14627  GCATTGTCAAAACTAAAGAGTGTTGTTAGTGGAGATATACTATCATATTCTATAGCTGGA  14686

Query  6305   CGTAATGAAGTTTTCAGCAATAAACTTATAAATCATAAGCATATGAACATCTTAAAATGG  6364
              |||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||| |||
Sbjct  14687  CGTAATGAAGTTTTCAGCAACAAACTTATAAATCATAAGCATATGAACATCTTAAAGTGG  14746

Query  6365   TTCAATCATGTTTTAAATTTCAGATCAACAGAACTAAACTATAACCATTTATATATGGTA  6424
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct  14747  TTCAATCATGTTTTAAATTTCAGATCAACAGAACTAAACTATAATCATTTATATATGGTA  14806
```

HRSVb

```
Query  1      GATAACATTACTATATTAAAAACTTACGTGTGCCTAGGTAGCAAGTTAAAAGGATCTGAA  60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14436  GATAACATTACTATATTAAAAACTTACGTGTGCCTAGGTAGCAAGTTAAAAGGATCTGAA  14495

Query  61     GTTTACTTAGTCCTTACAATAGGCCCTGCAAATATACTTCCTGTTTTTGATGTTGTGCAA  120
              |||||| |||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||| ||||||||||||
Sbjct  14496  GTTTACCTAGTCCTTACAATAGGCCCTTCAAATATACTTCCTGTTTTTAATGTTGTGCAA  14555

Query  121    AATGCTAAATTGATTTTTTCAAGAACTAAAAATTTCATTATGCCTaaaaaaaCTGACAAG  180
              ||||||||||||||| ||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14556  AATGCTAAATTGATTCTTTCAAGAACTAAAAACTTCATTATGCCTAAAAAAACTGACAAA  14615

Query  181    GAATCTATCGATGCAAATATTAAAAGCTTAATACCTTTCCTTTGTTACCCTATAACaaaa  240
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14616  GAATCTATCGATGCAAATATTAAAAGCTTAATACCTTTCCTTTGTTACCCTATAACAAAA  14675

Query  241    aaaGGAATTAAGACTTCATTGTCAAAATTGAAGAGTGTAGTTAATGGGGATATATTATCA  300
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||
Sbjct  14676  AAAGGAATTAAGACTTCATTGTCAAAATTGAAGAGTGTAGTTAATGGAGATATATTATCA  14735

Query  301    TATTCTATAGCTGGACGTAATGAAGTATTCAGCAACAAGCTTATAAACCACAAGCATATG  360
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14736  TATTCTATAGCTGGACGTAATGAAGTATTCAGCAACAAGCTTATAAACCACAAGCATATG  14795

Query  361    AATATCCTAAAATGGCTAGATCATGTTTTAAATTTTAGATCAGCTGAACTTAATTACAAT  420
              |||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14796  AATATCCTAAAATGGCTAGATCATGTTTTAAACTTTAGATCAGCTGAACTTAATTACAAT  14855

Query  421    CATTTATACATGATAGAGTCCACATATCCTTACTTAAGTGAATTGTTAAATAGTTTAACA  480
              |||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14856  CATTTATATATGATAGAGTCCACATATCCTTACTTAAGTGAATTGTTAAATAGTTTAACA  14915

Query  481    ACCAATGAGCTCAAGAAACTGATTAAAATAACAGGTAGTGTACTATACAACCTTCCCAAC  540
              |||||||||||||||| |||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||
Sbjct  14916  ACCAATGAGCTCAAGAAGCTGATTAAAATAACAGGTAGTGTGCTATACAACCTTCCCAAC  14975

Query  541    GAACAGTAACTTAAAATATCATTAACAAGTTTGGTCAAATTTAGATGCTAACACATCATT  600
              ||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14976  GAACAGTAACTTAAAGTATCATTAACAAGTTTGGTCAAATTTAGATGCTAACACATCATT  15035
```

Консервативний регіон для Риновірусу А:

HRVa

```
Query  1321   AGACTTTCTGGTCTAAAATCCCAGTTATGCTTGATGGAGATTGTATAATGGCTTTTGACT  1380
              | | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||| ||||| |
Sbjct  6358   AAATTTTCTGGTCTAAAATCCCAGTTATGCTTGATGGAGATTGCATAATGGCCTTTGATT  6417

Query  1381   ATACAAATTATGATGGTAGTATACACCCTGTCTGGTTTCAAGCTCTGAAAAAAGTTCTTG  1440
              | ||||||||||||| || |||||||||| ||||| ||||||| |||| ||||| ||||
Sbjct  6418   ACACAAATTATGATGGCAGCATACACCCTGTTTGGTTCCAAGCTTTGAAGAAAGTCCTTG  6477
```

```
Query  1441  AAAATTTATCTTTCCAATCTAATTTAATTGATAGATTGTGTTATTCCAAGCACTTGTTTA  1500
             | ||||| ||||||||| || ||||||||||||||||||||||| || || || |||||||
Sbjct  6478  AGAATTTGTCTTTCCAACCTGATTTAATTGATAGATTGTGTTACTCTAAACATTTGTTTA  6537

Query  1501  AATCAACATATTATGAAGTGGCAGGTGGAGTTCCTTCTGGGTGTTCTGGAACCAGTATAT  1560
             |||||||||| |||||||||||||||||||| |||||||| |||||||| || || ||||
Sbjct  6538  AATCAACATACTATGAAGTGGCAGGTGGAGTCCCTTCTGGATGTTCTGGGACTAGCATAT  6597

Query  1561  TCAATACTATGATTAATAACATTATAATAAGAACACTAGTTCTAGATGCATACAAAAATA  1620
             |||||||||||||||||| |||||||||||||||||||| |||||||||||||||| |
Sbjct  6598  TCAATACTATGATTAATAATATTATAATAAGAACACTAGTTTTAGATGCATACAAAAACA  6657

Query  1621  TTGATCTGGACAAGCTTAAAATAATTGCATATGGTGATGATGTGATTTTCTCTTATAAAT  1680
             ||||  |||||||| | ||||||||||||||||||||||||||||| || ||||| || |
Sbjct  6658  TTGACTTGGACAAGTTGAAAATAATTGCATATGGTGATGATGTGATCTTTTCTTACAAGT  6717

Query  1681  ATACTCTAGATATGGAAGCTATTGCTAATGAAGGAAAGAAATATGGACTTACAATAACAC  1740
             | ||| |||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |
Sbjct  6718  ACACTTTAGATATGGAAGCCATTGCTAATGAAGGAAAGAAATATGGACTTACAATAACTC  6777
```

Консервативний регіон для вірусу кору (Measles virus genotype B3 strain MVi/Calais.FRA):

```
14401 atgatgttgc caaattgctc aaagatatca acacaagcaa gcacaacctt cctatttcag
14461 ggggcagtct cgccaattat gaaatccatg ctttccgcag aatcgggttg aactcatctg
14521 cttgctacaa agctgttgag atatcaacat taattaggag atgccttgag ccaggggaag
14581 acggcttgtt cttgggtgag ggatcgggtt ctatgttggt cacttataag gagatactta
14641 aactaaacaa gtgcttctat aatagtgggg tttccgccaa ttctagatct ggtcaaaggg
14701 aattagcacc ctacccctcc gaagtcggcc ttgtcgaaca cagaatggga gtgggcaata
14761 ttgtcaaggt gctctttaac gggaggcccg aagtcacgtg gataggcagt gtagattgct
```

Проведено дизайн та синтез олігодезоксинуклеотидних праймерів для вірусів SARS-CoV-2, епідемічного грипу (А та Б), вірусів парагрипу 1-3 (Parainfluenza viruses 1-3), респіраторно-синцитіальних вірусів А і В та ортопневмовірусів людини (Orthopneumovirus A2, B1), риновірусів (Rhinovirus A (3D), вірусу кору (Measles virus D8, B3).

У якості внутрішнього контролю відібрано людський ген *B2M* [15, 16], для якого підібрано та синтезовано праймери.

Праймери були підібрані за допомогою бази даних https://primerdepot.nci.nih.gov/ та https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/ . Для уточнення та перевірки послідовностей олігонуклеотидних праймерів використано пошукові системи BLAST SEARCH (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) бази даних NCBI, UCSC Genome Browser (http://genome-euro.ucsc.edu).

1.3. Біоінформативний аналіз експресії генів уродженого імунітету для створення комбінованої тест-системи, дизайн та синтез праймерів для кПЛР

За даними біоінформативного аналізу та наших попередніх досліджень відібрано низку генів, залучених у формування уродженого імунітету у відповідь на вірусні інфекції (Таблиця 2).

Таблиця 2

Гени, залучені у формуванні уродженого імунітету, зміна експресії яких буде аналізуватись для створення тест-системи

Ген	Функція продукту гена	Наслідок зміни експресії
1	2	3
OAS1	Білок який синтезує 2 ', 5'-олігоаденілати (2-5Ac)	Експресія збільшується при вірусній інфекції, активує латентну РНКазу L
OAS2	Член родини 2-5A синтетаз	Схожа дія з OAS1
OAS3	Член родини 2-5A синтетаз	Схожа дія з OAS1
RNASEL	РНКаза L, розщеплює одноланцюгові ділянки вірусних РНК.	Експресія збільшується при вірусній інфекції, що призводить до деградації вірусної РНК та гальмування вірусної реплікації
ABCE1	Інгібітор РНКази L	Експресія зменшується при вірусній інфекції, що забезпечує активність РНКази L
EIF2AK2	Серин/треонін протеїнкіназа, яка активується після зв'язування з дволанцюговою РНК, задіяна в інгібуванні синтезу білка	Експресія збільшується при вірусній інфекції, інгібує синтез вірусних білків.

MX1	Білок резистентності до вірусу грипу	Експресія збільшується при вірусній інфекції, забезпечує противірусну активність через апоптоз клітин, інфікованих грипом.
TNF	Цитокін некрозу певних типів пухлин	Експресія збільшується при появі певних онкологічних клітин, індукує їх загибель.
IFNA2	Інтерферон α, цитокін I типу	Експресія збільшується при вірусній інфекції та онкології, індукуючи каскад імунних реакцій захисту
IFNB1	Інтерферон β, цитокін I типу	Експресія збільшується при вірусній інфекції та онкології, індукуючи каскад імунних реакцій захисту
IFNG	Інтерферон γ, цитокін II типу	Експресія збільшується при вірусній інфекції та онкології, що є вирішальним для вродженого і адаптивного імунітету проти вірусних і бактеріальних інфекцій та пухлин
IFNE	Інтерферон ε, унікальний цитокін I типу. *IFNE* на відміну від IFNA2 індукує більше генів у TNF-α сигнальному шляху та більшу генерацію АФК, фагоцитну активацію ніж IFN-α.	Вірус-індукована експресія *IFNE* викликає слабку вроджену імунну відповідь. Підвищується експресія у тканинах раку шийки матки, є потенційний молекулярний маркер при раку шийки матки.

IFNK	Інтерферон κ, цитокін I типу	Експресія IFNK може підвищитися вірусною інфекцією, іншими IFN типу I та II, індукуючи вроджену імунну відповідь.
IL12A	Інтерлейкін 12A, цитокін для Т-клітин незалежно від індукції IFN-γ	Експресія збільшується при вірусній інфекції та онкології, індукуючи диференціацію Т-хелперів
IL8	Інтерлейкін 8, хемокін, медіатор запалення.	Експресія збільшується при вірусній інфекції та онкології, є маркером процесу запалення.
CXCL10	Антимікробний хемокін підсистем CXC та ліганд для рецептора CXCR3	Експресія збільшується при вірусній та бактеріальній інфекції, регулюючи моноцити, натуральні кілери, Т-клітинну міграцію і модуляцію адгезії.
CXCL11	Антимікробний хемокін підсистем CXC	Експресія збільшується при вірусній та бактеріальній інфекції, викликає відповідь в активованих Т-клітинах. ІФН-γ є потужним індуктором його транскрипції
CXCL9	Антимікробний хемокін підсистем CXC, індукується IFN-γ і тісно пов'язаний з CXCL10 і CXCL11	Експресія збільшується при вірусній та бактеріальній інфекції, регулюючи моноцити, натуральні кілери, Т-клітинну міграцію і модуляцію адгезії.
IL1B	Інтерлейкін 1 β, цитокін - медіатор запальної реакції,	Експресія збільшується при вірусній та бактеріальній інфекції та

	клітинної проліферації, диференціювання та апоптозу.	ранніх стадіях онкозахворювань, є маркером процесу запалення.
Il6	Інтерлейкін 6, цитокін, який викликає запальні реакції через рецептор інтерлейкіну-6α.	Експресія збільшується при вірусній та бактеріальній інфекції, а також на ранніх стадіях онкозахворювань, є маркером процесу запалення.
IL10	Інгібітор фактора синтезу цитокінів людини. Протизапальний цитокін.	Експресія IL-10 призводить до контролю за зростанням первинної пухлини та зменшення метастатичного навантаження.
IL10R2 (IL10RB)	Рецептор IL-10, який модулює вроджену та адаптивну імунну реакцію.	Експресія IL10R2 знижується при запальних процесах. Висока експресія IL10R2 та STAT3 сприяє колоректальному канцерогенезу за допомогою сигналізації IL22 / STAT3.
CCL5	Ліганд C-C мотиву хемокінів, регулює функцію моноцитів, клітин пам'яті, Т-хелперів і еозинофілів, вивільнює гістамін з базофілів.	Експресія збільшується при вірусній інфекції, звязуючись з CCR5 інгібує ВІЛ.
CCL3	Ліганд C-C мотиву хемокінів, макрофагальний запальний білок 1α.	Експресія збільшується при вірусній інфекції, звязуючись з CCR5 інгібує ВІЛ.
CCL4	Ліганд C-C мотиву хемокінів, макрофагальний запальний білок 1ß.	Експресія збільшується при вірусній інфекції, звязуючись з CCR5 інгібує ВІЛ.

CCR5	Рецептор С-С мотиву хемокінів.	Експресія збільшується при вірусній інфекції, ВІЛ використовує CCR5, щоб увійти в CD4 клітини, а хемокіни CCL5, CCL3 і CCL4, зв'язуючись з CCR5, пригнічують ВІЛ інфекцію.
CD274 (PDL1)	Трансмембранний білок PD-L1, зв'язуються зі специфічними рецепторами на Т-лімфоцитах.	При підвищенні експресії відбувається пригнічення імунної системи, в т.ч. пригнічує антипухлинну імунну реакцію.
CD80	Поверхневий мембранний рецептор, що викликає проліферацію Т-клітин і продукцію цитокінів.	Експресія збільшується при вірусній інфекції, рецептор для аденовірусів підгрупи В.
CD86	Поверхневий мембранний рецептор.	Підвищення експресії веде до зв'язування з АПЦ Т-лімфоцитів 4, що інгібує активацію Т-клітин і знижує імунну відповідь.
CD40	Поверхневий мембранний рецептор надродини TNF-рецепторів.	Підвищення експресії має важливе значення для широкого спектру імунних і запальних реакцій.
CD14	MY-4 антиген, зв’язуючись з PAMP, транспортує їх до сигнальних рецепторів клітин.	Експресія збільшується при запаленні (інфекційні захворювання, онкологія).
NOSII	NO-синтаза.	Підвищення експресії призводить до утворення у великій кількості оксиду азоту, можливим є утворення пероксинітриту – потужного цитотоксиканта.

ARGII	Аргіназа II.	Метаболічний пригнічувач NOS, в мітохондріях конкурує з NO-синтетазами за субстрат – аргінін.
CALB1	Кальбіндін, потужний сенсор Ca^{2+} та H^{+}.	При зв'язуванні іонів Ca^{2+} нітрозилюється (в т.ч. пероксинітритом) і стає депо для NO.
PLA2G4A	Са-залежний фосфоліпідзв'язувальний білок.	Перетворює мембранні фосфоліпіди в арахідонову кислоту для її подальшої утилізації ліпоксигеназами чи циклооксигеназами.
PTGS2	Ключовий фермент синтезу простагландинів і тромбоксану А2.	Підвищення експресії призводить до розвитку болю та процесу запалення.
S100A1	Білок зв'язує S100A1 Ca^{+2}.	S100A1 є регулятором міокарда, покращує роботу серця шляхом регулювання обігу Ca^{2+} в саркоплазматичному ретикулуму.
CD14	MY-4 антиген, зв'язуючись з PAMP, транспортує їх до сигнальних рецепторів клітин.	Експресія збільшується при запаленні (інфекційні захворювання, онкологія)
LBP	Білок, який зв'язує ліпополісіхариди.	Гострофазний індуцибельний білок, індукується IL-1 і IL-6. В крові людини швидко збільшується при розвитку запалень.
PD1 (PDCD1)	Рецептор запрограмованої смерті.	Трансмембранний протеїн родини імуноглобулінів, що контролює загибель лімфоцитів.

CTLA4	Цитотоксичний Т-лімфоцит-асоційований протеїн 4.	Імуноглобулін, що передає інгібуючий сигнал до Т-клітин.
CD4	Мембранозв'язуючий глікопротеїн.	Експресується на поверхні деяких лейкоцитів. Відіграє ключову роль в активації імуностимулюючих Т-клітин.
CD8	Інтегральний мембранний глікопротеїн	Відіграє істотну роль в імунній відповіді і виконує численні функції у відповіді на зовнішні і внутрішні стимули.
CD 3	Основний ко-рецептор Т-клітинного рецептора.	Підвищення експресії *CD* може допомогти Т-клітині розпізнати ракову клітину і повністю активуватися.
CD223	Рецептор імунної контрольної точки (immune checkpoint receptor). Експресується на поверхні Т-лімфоцитів.	Негативно регулює клітинну проліферацію, активацію та гомеостаз Т-клітин аналогічно до CTLA-4 та PD-1.
NF-KB1	Білок, який входить до складу мультипротеїнового комплексу NF-κB.	Висока експресія під час вірусної інфекції індукує молекули запалення, цитокіни та хемокіни. Участь у вірусній реплікації.
RELA	Білок мультипротеїнового комплексу NF-κB, одна з основних субодиниць.	Модулює імунну відповідь та позитивно асоціюється з декількома видами раку. Зазнає високої експресії під час вірусної інфекції. Участь у вірусній реплікації.

NF-KBIA	Фосфопротеїн, інгібітор транскрипційного фактору NF-κB.	Експресія *NF-KBIA* регулюється активацією NF-κB, що забезпечує авторегуляцію цього сигнального шляху. Модулює імунну відповідь.
STAT1	Транскрипційний фактор, член мультипротеїнової родини *STAT*. Задіяний у процесах- транскрипція, поліморфізм, альтернативний сплайсинг.	Рецесивний дефіцит STAT1 є новою формою первинного імунодефіциту. Негативна регуляція STAT1 призводить до порушення IFNA, IFNB, IFNG, IL27.
STAT2	Білок родини STAT, активатор транскрипції, модуляція противірусного імунітету та пригнічення росту клітин.	За умов канцерогенезу шкіри, STAT2 підвищує експресію генів та секрецію прозапальних медіаторів, які, в свою чергу, активують онкогенний сигнальний шлях STAT3.
STAT3	Член сімейства білків STAT, активатор транскрипції, опосередковує експресію різних генів відіграючи ключову роль у багатьох клітинних процесах, таких як ріст клітин та апоптоз.	STAT може сприяти онкогенезу. Підвищена активність STAT3 у ракових клітинах призводить до зміни функції білкових комплексів, що контролюють експресію запальних генів.
STAT4	Транскрипційний фактор, що належить до сімейства білків STAT. Необхідний для розвитку клітин Т-хелперів з наївних клітин CD4+ Т-клітин.	Бере участь у кількох аутоімунних та ракових захворюваннях. Підвищується експресія *STAT4* у пацієнтів з виразковим колітом та у Т-клітинах шкіри хворих на псоріаз.

STAT5A	Транскрипційний фактор, що належить до сімейства білків STAT.	Ключова роль STAT5A при лейкемії, раку молочної залози, товстої кишки, голови, шиї та передміхурової залози. Через свою невід'ємну роль у розвитку імунних клітин, STAT5A може сприяти розвитку пухлини, порушуючи імунний нагляд.
STAT5B	Транскрипційний фактор, що належить до сімейства білків STAT, активатор транскрипції.	Активація STAT5B спостерігається у пухлинних тканинах. STAT5B пов'язаний з запущеною пухлинною стадією при колоректальному раку, гліобластомі та гепатоцелюлярній карциномі.
STAT6	Фактор транскрипції, що бере участь у регулюванні імунітету.	Надекспресія STAT6 у ряді пухлин вказує на те, що STAT6 переважно функціонує як онкоген.
PML	Білок супресор пухлин. Роль у апоптозі, стабільності геному, контроль ділення клітин.	Експресія PML, що індукується вірусною інфекцією, призводить до ізоляції вірусних білків та інактиваці вірусних віріонів. Низька регуляція PML чи мутація цього гена призводить до розвитку пухлини, дозволяючи клітині накопичувати додаткові генетичні пошкодження.
TLR3	Toll-подібний рецептор 3, який індукує експресію про-запальних цитокінів та	Підвищення експресії викликане вірусною інфекцією індукує тканинне запалення через індукцію

	виступає ко-стимулюючою молекулою, яка запускає вроджений та набутий імунітет.	IL-6, TNF-α, CXCL8/IL-8 та рекрутинг ефекторних клітин. Підвищення експресії TLR3 може мати протипухлинну дію у результаті активації вродженої імунної відповіді та апоптозу.
TLR7	Toll-подібний рецептор 7. Функція схожа до *TLR3*.	Вірус-індуковане підвищення експресії бере участь у активації адаптивної імунної відповіді (IFN-γ, CXCL10/IP-10, CXCL9/MIG). Висока експресія пов'язана з прогресуванням пухлини.

Проведено дизайн та синтез олігодезоксинуклеотидних праймерів для аналізу відносної експресії генів уродженого імунітету вище перелічених генів. Праймери були підібрані за допомогою бази даних https://primerdepot.nci.nih.gov/ та https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/ .

Для уточнення та перевірки послідовностей олігонуклеотидних праймерів використано пошукові системи BLAST SEARCH (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) бази даних NCBI, UCSC Genome Browser (http://genome-euro.ucsc.edu).

РОЗДІЛ 2. ЗБІР БІОЛОГІЧНИХ РІДИН ЗДОРОВИХ ТА ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРИХ ТА СТВОРЕННЯ КОЛЕКЦІЙ ДНК ТА РНК

2.1. Забір зразків біологічних рідин

Для виконання запланованого наукового дослідження використовувалася кров від здорових волонтерів, яка була надана Клінічною лікарнею «Феофанія» згідно договору про наукове співробітництво та з дотриманням угод Гельсінської декларації. Зразки цільної крові від коронавірус-інфікованих пацієнтів було отримано з Олександрівської клінічної лікарні м. Києва та Київської міської клінічної лікарні №17.

Забір зразків біологічних рідин повинен здійснювати кваліфікований спеціаліст відповідно до наказу МОЗ України від 30 липня 2013 року N 662 «Про затвердження Методичних рекомендацій "Порядок забору, транспортування та зберігання матеріалу для дослідження методом полімеразної ланцюгової реакції». Для забору цільної необробленої крові використовують пробірки з ЕДТА фірми Vacumed для запобігання згортання крові та деградації тотальної РНК.

Для забору зразків назо-орофарингеального зішкрібу повинен здійснювати кваліфікований спеціаліст відповідно до наказу МОЗ України від 17.09.2020 р. № 2122 Про внесення змін до Стандартів медичної допомоги «Коронавірусна хвороба (COVID-19)», Додаток 3. Відбір, зберігання та транспортування зразків матеріалів для тестування на SARS-CoV-2. Для забору та транспортування зразків зішкрібу використовують стерильні мікропробірки (кріопробірки) вільні від РНК- та ДНКаз.

Дані про пацієнтів, зразки цільної крові або зішкрібу, яких надійшли в лабораторію, реєструють у Журналі реєстрації надходження зразків здорових та інфекційних хворих з дотриманням усіх правил Гельсінської Декларації та Етичних комітетів медичних закладів.

2.2. Створення колекцій зразків РНК та кДНК із зразків цільної крові від здорових волонтерів та пацієнтів з гострою формою COVID-19

Для створення колекцій РНК було відібрано лейкоцитарну фракцію цільної крові (PBC -лейкоцитарну плівку) після центрифугування цільної крові при 2000 rpm 15 хв при +4°C. Використовуючи наконечник з фільтром, акуратно відбирали лейкоцитарну масу з поверхні осаду еритроцитів в об'ємі 0,2 мл (Рис. 2) і переносили в стерильну пробірку типу "Еппендорф" об'ємом 1,5 - 2,0 мл і додавали TRI-реагент (компонент з набору для виділення РНК, Direct-zol RNA Miniprep Plus з TRI-реагентом) у співвідношенні 1:3 для попередження деградації РНК. Суміш лейкоцитів з TRI-реагентом перемішували інтенсивно на Vortex протягом 30 секунд та одразу заморожували при -80°C у низькотемпературному холодильнику.

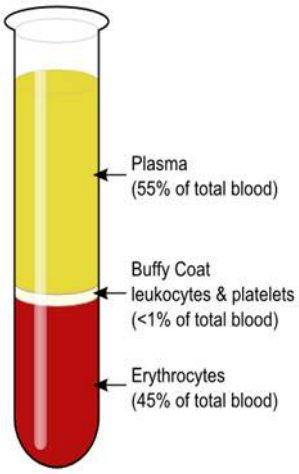


Рисунок 2. Схематичне зображення фракціонованої цільної крові

2.3. Виділення тотальної РНК

Виділення РНК із зразків PBC проводили використовуючи набір для виділення РНК Direct-zol™ RNA Miniprep Plus (Zymo Research). Процес виділення РНК проводили згідно виробника із певними модифікаціями. Зразок PBC із TRI-реагентом розморожували і перемішували на Vortex протягом 15 хв до повного розчинення осаду. До лізату лейкоцитів (PBC) додавали хлороформ (у співідношені 1 мл TRI-реагенту : 200 мкл хлороформу), перемішували та інкубували 3 хв. Після інкубації лізат центрифугували 11,6 g протягом 15 хв при

+4 °С. Надалі відбирали водну фазу та змішували з рівним об’ємом 95-100% етанолу. З етапу нанесення зразків з етанолом на Zymo-Spin колонки, виділення РНК проводимо у відповідності до протоколу виробника Direct-zol™ RNA Miniprep Plus. Виділену та очищену РНК розчиняли у 40 мкл води. Для перевірки кількості та якості виділеної РНК відбирали 10 мкл, тоді як інші 30 мкл дуже швидко заморожували при -80°С у низькотемпературному холодильнику. Кількість виділеної тотальної РНК визначали спектрометрично за допомогою MaestroNano Pro Micro-Volume MN-913 spectrophotometer (MAESTROGEN, Тайвань).

2.4. Перевірка якості РНК

Чистоту РНК оцінювали за відношенням поглинання 260/280 нм. Цілісність виділеної РНК оцінювали на приладі Microchip electrophoresis system (MCE-202/MultiNA SHIMADZU, Німечина) відповідно до протоколу наведеному в інструкції приладу використовуючи набір реагентів для калібрування РНК, RNA-1000 (RNA reagent kit for MultiNA) (SHIMADZU, Німечина), SYBR Green II RNA gel stain (lifetechnologies, США) та реагент RNaseZap RNase Decontamination Solution, виділену тотальну РНК. Аналіз якості виділеної РНК виявляли за співвідношенням інтенсивності смуг 28S:18S рРНК (2:1). Результат аналізу видається у вигляді розмірних одиницях довжин пар нуклеотидів (пн). Зразки РНК, які мали відповідну інтенсивність смуг 28S – 4700 пн. та 18S – 1900 пн у подальшому зберігалися та можуть бути використані у наступній роботі.

2.5. Синтез кДНК

З оброблених ДНКазою І, вільною від РНКаз, зразків тотальної РНК синтезували кДНК за допомогою Thermo Scientific Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit згідно протоколу виробника. Для синтезу використовували 1 мкг виділеної тотальної РНК, 4 мкл реакційної суміші та 2 мкл суміші ферментів, воду вільну від РНКаз (загальний об'єм реакційної суміші 20 мкл). Інкубували

реакції 10 хвилин при 25°C та 30 хв. при 50°C. Термінували реакції при 85°C протягом 5 хв. Зберігали синтезовану кДНК при -20°C (короткотривале зберігання – до тижня) у морозильній шафі CB105-S або при -70°C (довготривале зберігання).

З отриманих зразків було виділено тотальну РНК та перевірено її якість за допомогою електрофорезу на чипі (Рис. 3, 4).

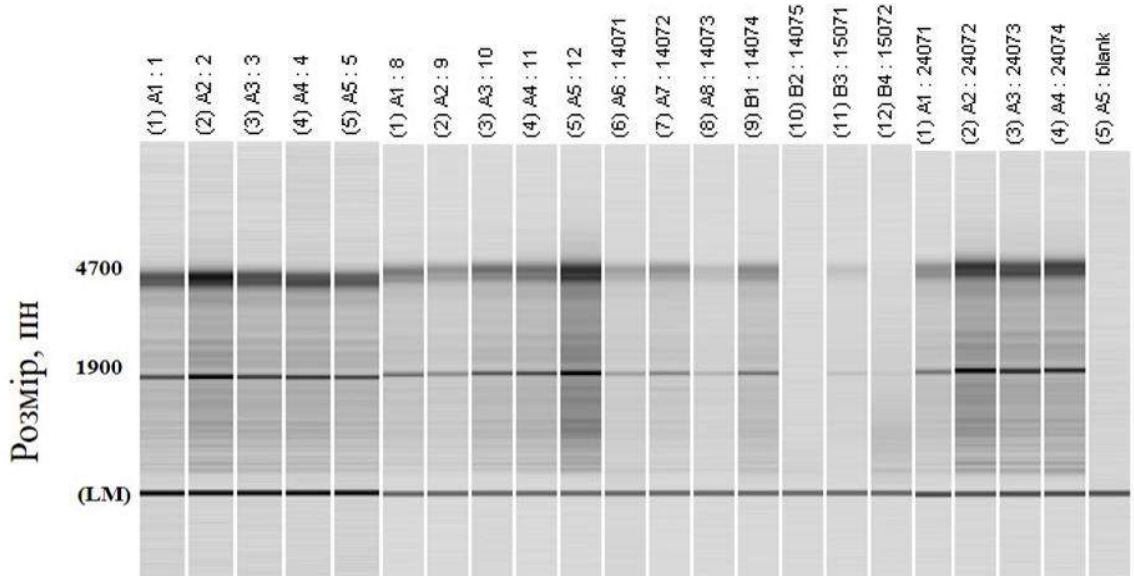


Рисунок 3. Зображення електрофорезного гелю зразків тотальної РНК лейкоцитів пацієнтів з COVID19: blank – негативний контроль (без РНК); 14075 та 15072 – деградовані зразки РНК.

На Рисунку 3 та 4 показано також деградовані зразки РНК під час виділення (14075, 15072, 0816). Оскільки аналізуючи дані зразки, нами не було виявлено відповідні інтенсивності смуг 28S та 18S, тому дані зразки не зберігалися та не можуть використовуватись для наступних досліджень. Тоді як якісні зразки РНК надалі зберігаються при -80°C у низькотемпературному холодильнику у відділені «колекція РНК». Зразки РНК можуть зберігатися і використовуватися протягом 1 року, у випадку коли зразки зберігаються більше 1 року перед їх використанням потрібно проводити повторно аналіз їх якості.

Дані та відомості про результати аналізу зразків РНК колекції вносяться у Журналі реєстрації колекції РНК зразків.

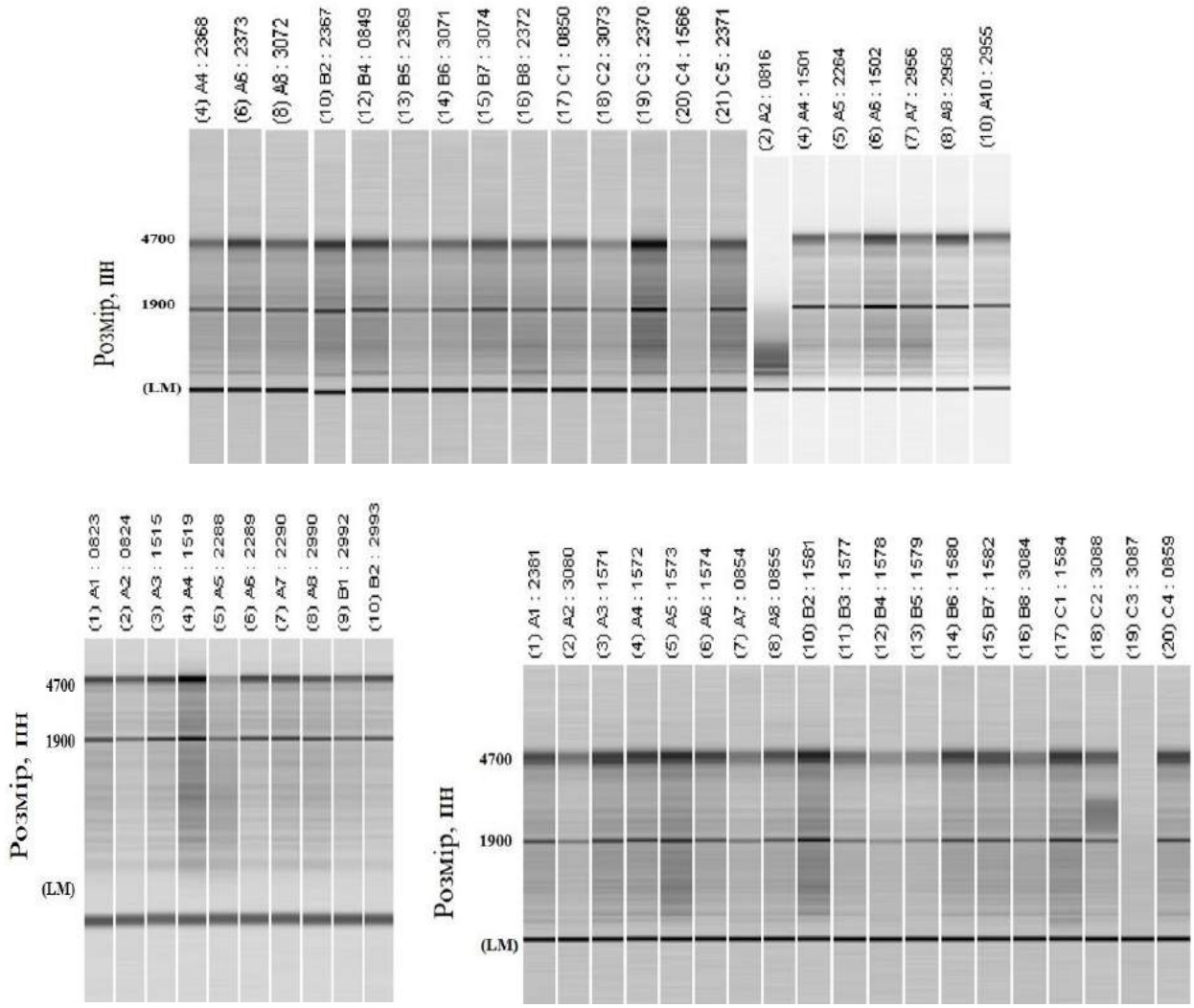


Рисунок 4. Приклади зображення електрофорезних гелів зразків тотальної РНК, яку виділено з лейкоцитів здорових волонтерів: 0816 – деградований зразок РНК

Далі з отриманих зразків тотальної РНК синтезували кДНК як описано вище. Синтезовану кДНК зберігали при -80°С протягом 2 та більше років. Дані та відомості про кДНК зразків колекції вносяться у Журналі реєстрації колекції кДНК зразків разом з результатами Ct циклів кПЛР референсного гену *TBP* для аналізу якості отриманої кДНК (Таблиця 3, 4).

Таблиця 3

Характеристика кДНК з лейкоцитів здорових волонтерів.

№	№ зразка	Ct *TBP*
1	2953	27,1
2	1501	27,3
3	2264	26,8
4	1502	26,2
5	2956	27,0
6	2958	27,2
7	2955	27,5
8	0823	27,9
9	1515	27,4
10	1519	28,0
11	2288	27,2
12	2289	28,2
13	2290	27,4
14	2990	27,6
15	2993	27,0
16	2366	28,8
17	2367	27,6
18	2368	28,7
19	2369	29,0
20	2370	28,1
21	2371	27,5
22	2372	29,1
23	2373	28,0
24	3071	28,6
25	3072	27,9
26	3073	27,3
27	3074	27,8
28	0849	28,2
29	0850	28,0
30	1566	30,3
31	2381	27,6
32	1571	28,2
33	1572	27,4
34	1573	27,9
35	1574	28,2
36	1577	28,9
37	1578	29,0
38	1579	29,0
39	1580	27,3

40	1582	28,3
41	1584	28,5
42	0854	28,1
43	0855	28,1
44	0859	27,7
45	3080	29,7
46	3084	29,9
47	3087	27,4
48	3088	28,26
49	1581	27,7

Таблиця 4

Характеристика кДНК з лейкоцитів пацієнтів з COVID19.

№	№ зразка	Ct *TBP*	Дата синтезу
1	1	29,4	4.06.20
2	2	26,9	4.06.20
3	3	28,1	4.06.20
4	4	28,2	4.06.20
5	5	29,3	4.06.20
6	8	27,3	1.09.20
7	9	27,4	1.09.20
8	10	27,5	1.09.20
9	11	27,8	1.09.20
10	12	27,3	1.09.20
11	14071	28,1	1.09.20
12	14072	27,8	1.09.20
13	14073	28,5	1.09.20
14	14074	28,0	1.09.20
15	15071	28,5	1.09.20
16	24071	29,1	4.09.20
17	24072	28,3	4.09.20
18	24073	28,8	4.09.20
19	24074	28,5	4.09.20

2.6. Створення колекції кДНК із зразків назо-орофарингеального зішкрібу від здорових та пацієнтів з гострою формою COVID-19

Для виконання наукового дослідження використовувались зразки назо-орофарингеального зішкрібу пацієнтів на наявність РНК збудника SARS-CoV-2, які було отримано з Центру громадського здоров'я МОЗ України згідно договору про наукове співробітництво. До зразків, перед транспортуванням, попередньо

було додано лізуючий буфер DNA/RNA Shield (у співвідношені 100 мкл зразку : 100 мкл буферу), який інактивує вірус SARS-CoV-2 (компонент Quck-DNA/RNA Viral kit).

Виділення РНК вірусу із зішкрібу пацієнтів проводили використовуючи набір для виділення РНК вірусу Quck-DNA/RNA Viral kit (Zymo Research). Процес виділення РНК проводили згідно виробника із певними модифікаціями. Зразок розморожували і перемішували на Vortex протягом 15 хв до повного розчинення осаду та проводили виділення РНК проводимо у відповідності до протоколу виробника Quck-DNA/RNA Viral kit. Однак останній етап елюції проводили у 20 мкл. Перевірку кількості та якості виділеної РНК не проводили через дуже низьку концентрацію виділеної РНК. Надалі зі зразків РНК одразу проводили синтез кДНК.

Зі зразків РНК синтезували кДНК за допомогою Thermo Scientific Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit згідно протоколу виробника. На одну реакцію об’ємом 20 мкл використовували 4 мкл реакційної суміші та 2 мкл суміші ферментів та 14 мкл виділеної РНК. Реакційну суміш інкубували спочатку 10 хвилин при 25°C, а потім 30 хв. при 50°C. Реакцію зупиняли нагріванням протягом 5 хв при 85°C. Синтезовану кДНК зберігали при -80°C. Дані та відомості про кДНК зразків колекції вносяться у Журналі реєстрації колекції кДНК зразків. Відомості про цю колекцію за результатами аналізу SARS-CoV-2 та внутрішніх контролів представлені у Таблиці 5.

Таблиця 5

Характеристика кДНК з зішкрібу пацієнтів з позитивним та негативним результатом на наявність SARS-CoV-2.

№	№ зразка	*SARS-CoV-2* наявність	Ct внутрішнього контролю	Назва внутрішнього контролю
1	353	+	31,4	*B2M*
2	358	+	38,9	*B2M*
3	9	+	30,5	*B2M*
4	21949	+	31,3	*B2M*
5	1	-	30,3	*ACT*
6	2	-	35,1	*ACT*
7	3	-	32,5	*ACT*
8	4	-	32,8	*ACT*
9	5	-	27,9	*ACT*
10	6	-	25,5	*ACT*
11	100	+	44	*B2M*
12	100	+	41	*B2M*
13	67	-	36	*B2M*
14	18+	+	26	*B2M*
15	24	-	24.8	*B2M*
16	62	+	25.2	*B2M*
17	62*	+	32	*B2M*
18	19391 (1)	+	37	*ACT*
19	19397 (2)	+	36,6	*ACT*
20	19401 (3)	-	38,1	*ACT*
21	20161 (4)	-	36,7	*ACT*
22	20165 (5)	+	34,6	*ACT*

23	20177(6)	+	31,1	*ACT*
24	20329(9)	+	35,6	*ACT*
25	4H	-	21.6	*ACT*
26	5T	-	20.1	*ACT*
27	353	+	28.3	*ACT*
28	358	-	40.5	*ACT*
29	5B	+	23	*ACT*
30	6B	+	23	*ACT*
31	1000	-	23	*ACT*
32	21519	+	30	*ACT*
33	171	-	23	*ACT*
34	86742	+	31.3	*ACT*
35	8660	-	30.4	*ACT*
36	8643	-	29.5	*ACT*
37	8637	-	30.7	*ACT*
38	8661	-	31.2	*ACT*
39	8631	-	33.1	*ACT*
40	8639	-	37.1	*ACT*
41	8599	-	31.3	*ACT*
42	8598	-	31.5	*ACT*
43	8601	-	32.1	*ACT*
44	8602	-	33.4	*ACT*

РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ ТА ПІДБІР МОЛЕКУЛЯРНИХ МЕТОДІВ СТВОРЕННЯ ДІАГНОСТИКУМІВ

Боротьба з пандемією COVID-19 засвідчила, що для мінімізації негативних наслідків поширення інфекції в Україні, зменшення летальних випадків і подальшого відновлення економіки країни потрібно проводити широке тестування населення та ізоляцію інфікованих пацієнтів. Тільки в семи країнах світу виготовляють власні ПЛР тест-системи на основі мічених Taq-Man проб. Зараз розроблені більш дешеві ПЛР діагностики на основі інтеркалюючих SYBR Green барвників, LAMP технологій (ізотермічна петльова ампліфікація) та ін. [1, 2]. Кожен з них має свої переваги та недоліки. Як показав досвід пандемії COVID-19 наша держава повинна розраховувати в першу чергу на свої власні ресурси, включаючи діагностикуми власного виробництва. Тому вкрай важливим для України є розробка вітчизняних засобів ефективної діагностики. З іншого боку, хоча методи кількісної ПЛР широко використовуються через їх високу чутливість і специфічність, вони все ще мають деякі недоліки. Коротко кажучи, для належного виконання таких тестів необхідні надійне постачання електроенергії, дорогі прилади та навчений персонал. В той же час метод ізотермічної ампліфікації нуклеїнової кислоти, володіючи високою чутливістю та специфічністю є дешевим, простим і доступними для широкого кола пацієнтів. На відміну від полімеразної ланцюгової реакції, ізотермічна ампліфікація ДНК або РНК за допомогою Bst-полімерази відбувається при постійній температурі (близько 65°C) і тому є швидшою, ніж ПЛР, оскільки не потребує часу на термічний цикл, порівняно з ПЛР.

Отже, враховуючи, що молекулярно-біологічні методи детекції, що є базою тест-систем, це багатостадійні та дорогі системи, метою цього дослідження є відпрацювання низки підходів для спрощення та здешевлення тестів без значної втрати чутливості та з високою специфічністю.

Перший крок, який потребує доопрацювання та потребує іноземних наборів та обладнання – це виділення РНК з досліджуваних зразків.

Ми дослідили можливість отримання РНК зі зішкрібів за стандартною процедурою виділення РНК – фірмові набори (Zymo Research) та фенол-хлороформна екстракція, а також пряма детекція, яка включає різновиди термічної обробки зразків без виділення РНК для прямого визначення. Останній підхід може значно здешевити аналіз та скоротити час на проведення аналізу у разі отримання достатньої кількості цілісної РНК для кПЛР аналізу. Методи відпрацьовувались на референсному гені *B2M* (Рис. 5, 6)

Homo sapiens beta-2-microglobulin (B2M), mRNA
Sequence ID: NM_004048.2 Length: 987 Number of Matches: 1
Related Information
Genome Data Viewer-aligned genomic context
Range 1: 335 to 421 GenBank Graphics Next Match Previous Match

```
Query  18   CTTACATGTCTCGATCCCACTTAACTATCTTGGGCTGTGACAAAGTCACATGGTTCACAC  77
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  421  CTTACATGTCTCGATCCCACTTAACTATCTTGGGCTGTGACAAAGTCACATGGTTCACAC  362

Query  78   GGCAGGCATACTCATCTTTTTCAGTGG  104
            |||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  361  GGCAGGCATACTCATCTTTTTCAGTGG  335
```

Д

Рисунок 5. Схема експерименту з відпрацювання методів отримання РНК та проведення кПЛР за допомогою різних підходів: А – Методи виділення РНК; Б – варіанти кПЛР реакцій; В – електрофореграма продуктів кПЛР; Г –

хроматографа секвенування продуктів кПЛР отриманих різними методами виділення РНК; Д – гомологія продуктів секвенування до послідовності гена B2M.

У результаті проведеного дослідження ми показали, що пряме визначення РНК за допомогою термічної обробки зразків дає специфічний кПЛР продукт, який підтверджено за допомогою секвенування.

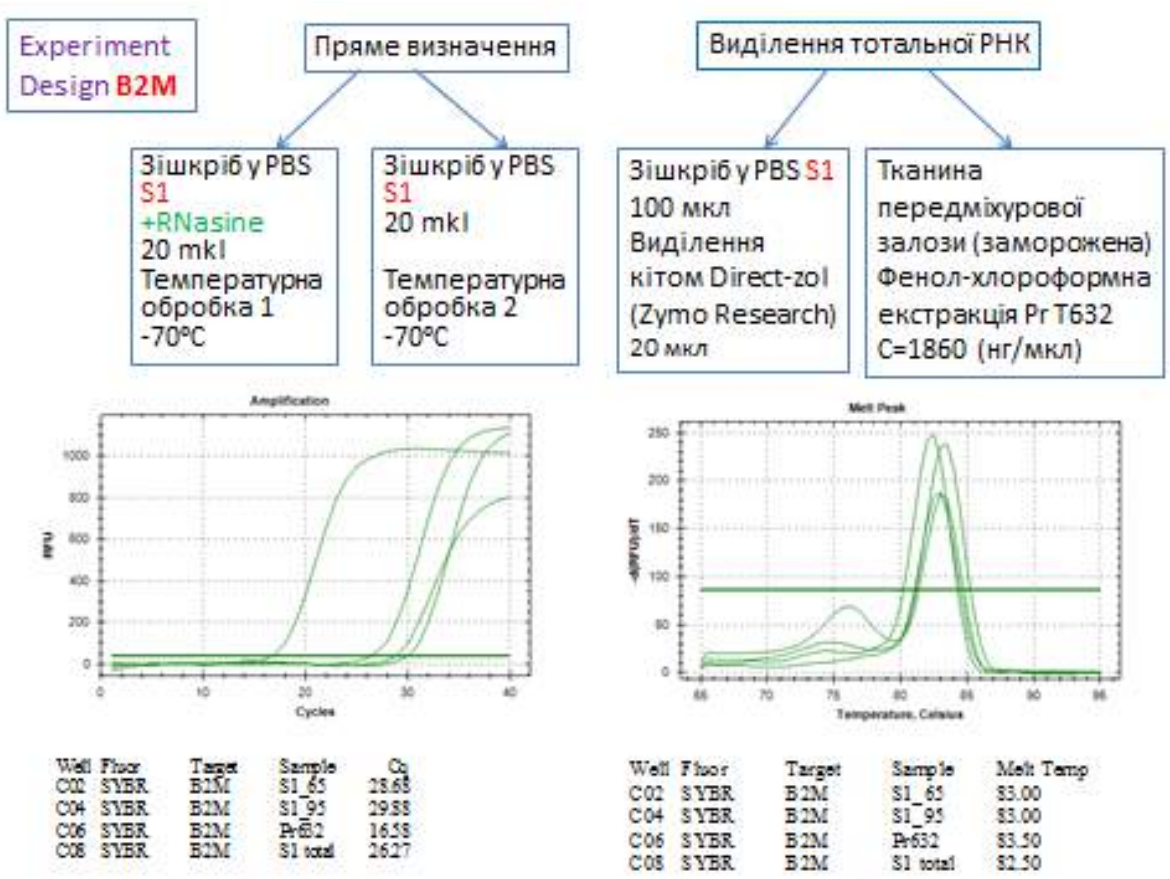


Рисунок 6. Показники Ct та температури плавлення продуктів кПЛР досліджуваних зразків при використанні стандартного протоколу.

Графіки ампліфікації кПЛР реакцій (Рис.6) та плавлення продуктів реакції теж підтверджують як навність специфічного продукту, так достатню чутливість методу кПЛР для прямої детекції експресії досліджуваного гена у біологічних зразках.

Наступним кроком нашої роботи було відпрацювання умов реакцій для Bst-полімерази, враховуючи, що при додаванні пари праймерів ми отримували неспецифічні продукти реакції. Відомо, що Bst-полімераза має властивості як

ДНК-полімерази, так і ревертази, ми припустили можливість її використання саме як ревертази для кПЛР аналізу. Дані наведено на Рисунку 7.

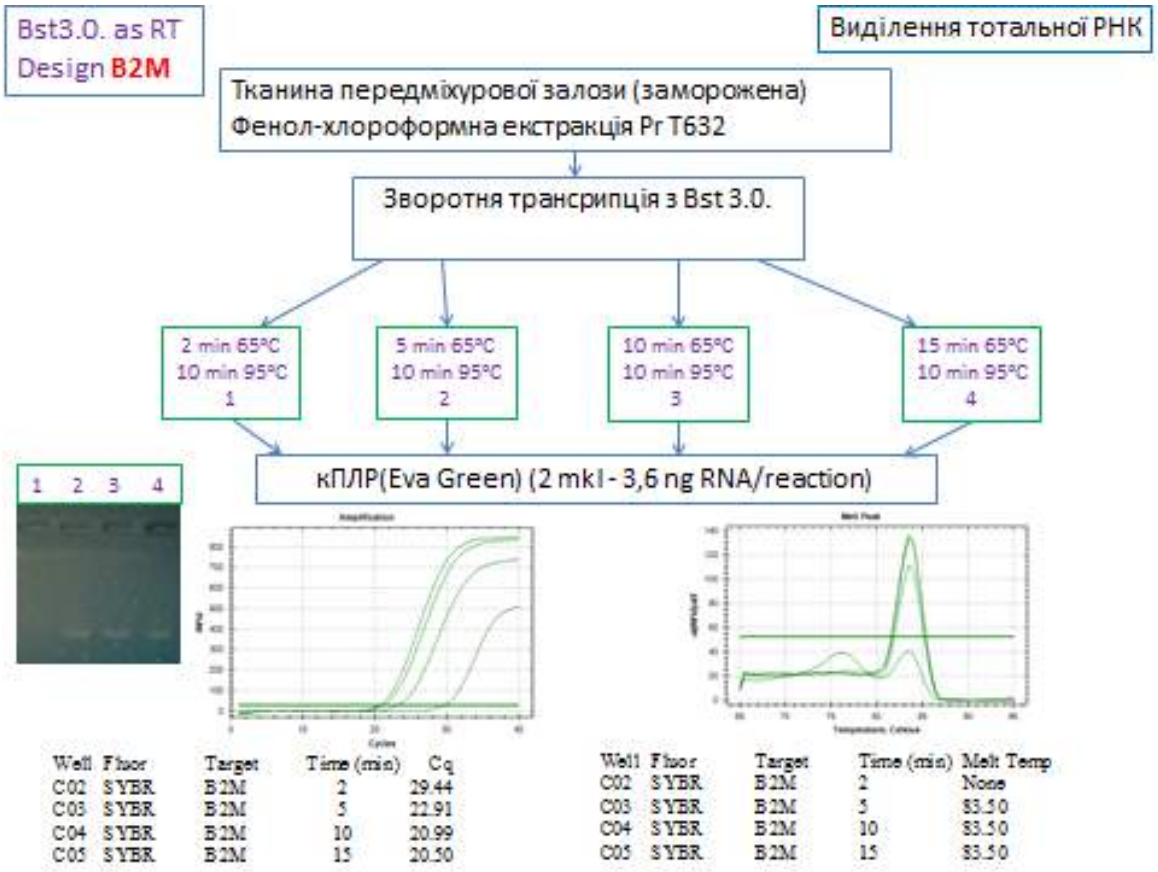


Рисунок 7. Відпрацювання двокрокових кПЛР реакцій з використанням ізотермічного фермента Bst3.0.

На відміну від стандартних ревертаз, ДНК-полімераза має більшу силу та швидкість реакцій, тому ми встановили діапазон часу проведення реакцій від 2 до 15 хвилин. Отримані дані свідчать, що максимум продукту у реакціях отримується в проміжок часу 10-15 хвилин. Як свідчать дані плавлення – отримано специфічні продукти досліджуваного гена B2M з температурою плавлення 83,5°C.

РОЗДІЛ 4. НАПРАЦЮВАННЯ РЕКОМБІНАНТНОГО ФЕРМЕНТУ BST ДНК-ПОЛІМЕРАЗИ ДЛЯ СТВОРЕННЯ ЕКСПРЕС ТЕСТ-СИСТЕМИ НА ОСНОВІ ІЗОТЕРМІЧНОЇ ПЛР

Нуклеотидну послідовність, що кодує великий фрагмент Bst ДНК полімерази, клонований у вектор pGH, було синтезовано ATG biosynthetics GmbH (Німеччина). Цю послідовність переклонували у вектор для експресії білків pET-21a по сайтах рестрикції Nde I та Xho I. Отриманий конструкт pET-21a-Bst було трансформовано у клітини *E. coli*, штам BL21 (DE3) pLysS методом електропорації. Було проведено оптимізацію умов експресії Bst ДНК полімерази у клітинах *E. coli*. На першому етапі тестували рівень експресії цільового білка при культивуванні клітин у різних живильних середовищах: Lysogenic broth, фосфатному середовищі (5,6 г/Л K_2HPO_4, 28,9 г/л KH_2PO_4, 10 г/л дріжджового екстракту), 2xYT середовищі і Terrific Broth (ТВ-середовище). Найвищий рівень експресії спостерігали у клітинах, що культивувались у ТВ-середовищі, для якого оптимізували решту умов: температуру (тестували при 25 і 37°C), концентрацію індуктора експресії (0,5 або 1 мМ IPTG), а також тривалість експресії (5 і 20 годин). В якості оптимальних умов були вибрані: інкубація 5 годин при 37°C з концентрацією індуктора - 1 мМ IPTG. Клітини збирали центрифугуванням при 4 000 g протягом 20 хв і зберігали замороженими при -80°C. Осад бактеріальних клітин ресуспендували в 70 мл 25 мМ Трис-HCl (pH 7,5), 1 мМ PMSF, 10 мМ β-меркаптоетанолу, доповненого 1,5 таблетками коктейлю інгібіторів протеаз cOmplete™ (EDTA-free). Клітини інкубували на льоду протягом 30 хв для повного лізису, руйнували ультразвуком 8×30 сек з 1 хв перервами (4 °C) і центрифугуванням при 20 000 g. Отриманий розчин змішували з Ni-NTA Sepharose Fast Flow (5 мл 50% суспензії, «GE Healthcare», Швеція), попередньо врівноваженою тим же буфером та інкубували протягом 1,5 год при 130 об/хв. Потім Ni-NTA промивали буфером А (25 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 0,1 мМ PMSF, 1 мМ β-меркаптоетанол, 300 мМ NaCl, 10 мМ імідазол), а потім буфером А, що містив 600 мМ NaCl. Bst полімеразу елюювали з колонки буфером А з 400 мМ імідазолом. Найчистіші фракції об'єднували, діалізували

протягом ночі проти буфера В (50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 1 мМ ДТТ, 20% (об/об) гліцерола) та зберігали при −80°С. Наявність білка у фракціях елюції визначали якісно за допомогою реактива Бредфорда (Roth) і аналізували електрофорезом у 10% ПААГ в умовах денатурації білків. Чистота отриманої Bst ДНК полімерази по даним електрофореза була більше 90 %.

РОЗДІЛ 5. РОЗРОБКА ТЕСТ-СИСТЕМ ТА АНАЛІЗ РЕЗУЛЬТАТІВ ТЕСТІВ НА ВИЗНАЧЕННЯ ВІРУСНИХ ПАТОГЕНІВ

5.1. Перевірка роботи праймерів, ферментів, їх співвідношення, методів підготовки зразків та оптимізація роботи ізотермічної ПЛР, ПЛР систем з флуоресцентною детекцією для визначення SARS-CoV-2

На попередньому етапі роботи учасниками проєкту було підібрано праймери до консервативної частини N-протеїну SARS-CoV-2 та показано за допомогою біоінформатичних методів їх унікальність стосовно відпалу на цьому протеїні саме цього типу коронавірусу. Наші дослідження на COVID-19–позитивних зразках за допомогою секвенування (Рис. 8) підтвердили біоінформатичні дані про специфічний ПЛР продукт N-протеїну SARS-CoV-2.

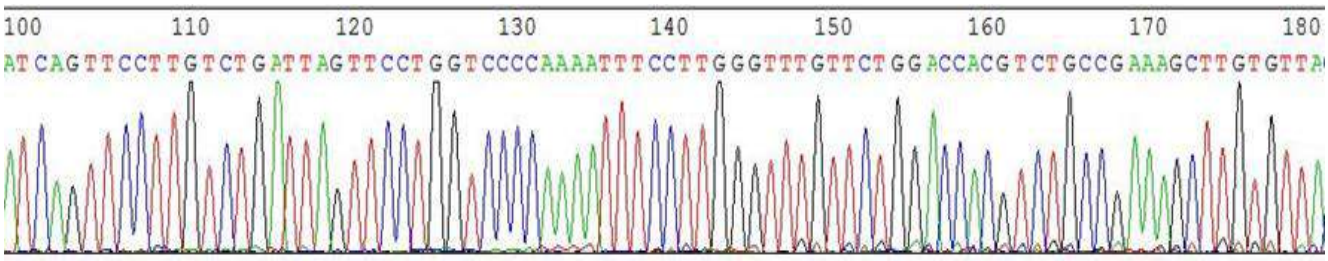


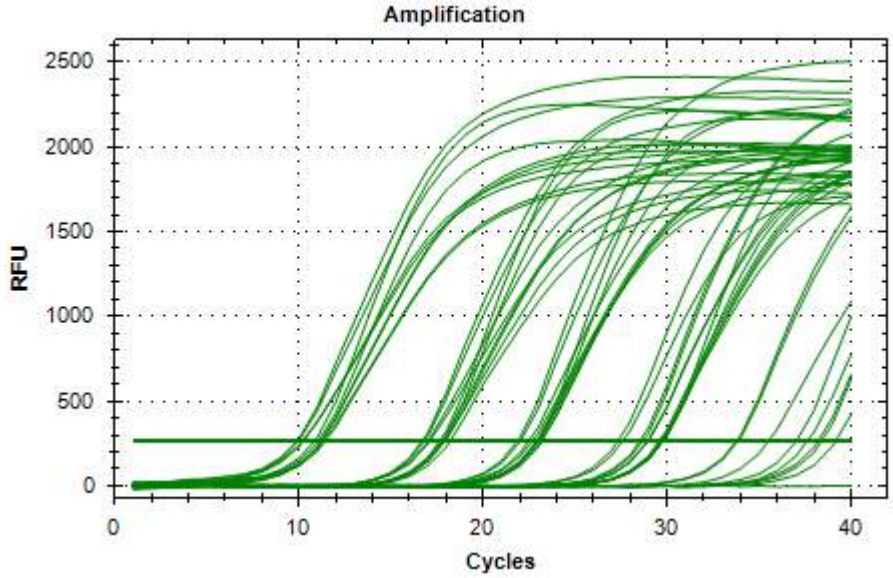
Рисунок. 8. Приклад хроматограми ПЛР продукту N-протеїну SARS-CoV-2 з COVID-19–позитивного зразка

Крім того виконавцями були підібрані інші праймери до N-білку та до шиповидного білка (S-протеїна) та перевірено їх роботу. Враховуючи, що S-протеїн є високомутованим – стабільність роботи цих праймерів при появі нових штамів SARS-CoV-2 є під питанням.

Виконавцями проекту для розробки кПЛР тест-систем було створено позитивний контроль, який представляє собою плазміду, що містить обрану ділянку N-білку SARS-CoV-2. На Рис. 9 представлено дослідження ефективності кПЛР реакцій на серії 10-и кратних розведень позитивного контролю трьох пар праймерів, яке свідчить як про високу ефективність реакцій (92-95%) (А), наявність одного специфічного продукту у кожні реакції (Б) та високу чутливість

методу, який дозволяє виявити 2-5 копій вірусу у досліджуваному зразку (останнє розведення позитивного контролю).

А



Б.

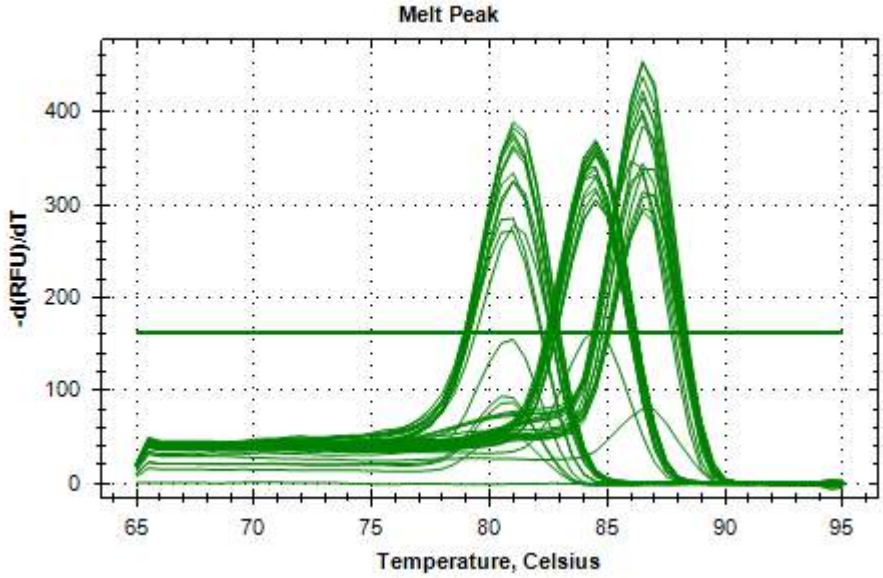


Рисунок 9. Криві ампліфікації (А) та плавлення (Б) ПЛР продуктів з праймерів до N-білку SARS-CoV-2 у серії 10-и кратних розведень позитивного контролю для визначення ефективності реакцій та чутливості методу

Порівняння між собою ефективності роботи праймерів на N- та S-білки (Рис. 10) показало, що в одних і тих же SARS-CoV-2 позитивних зразках показники Ct дуже відрізняються. Пізні цикли для праймерів на S-білок можна

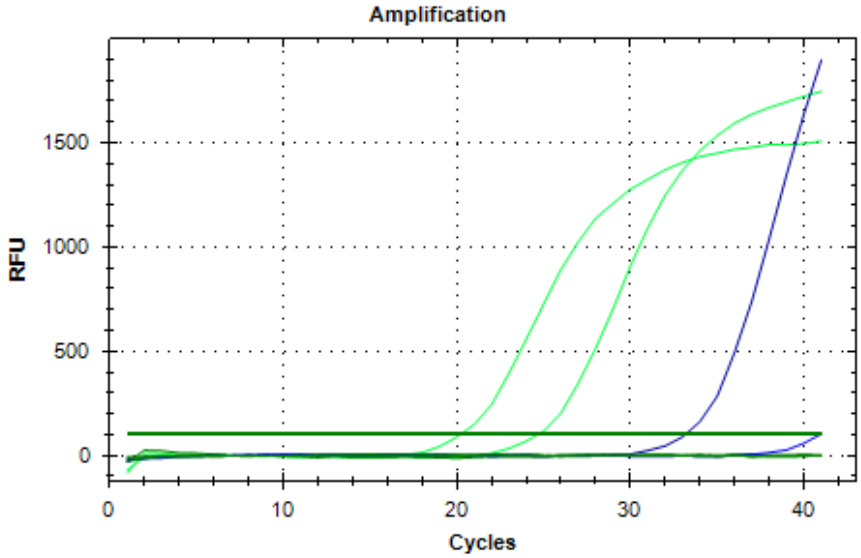


Рисунок 10. Криві ампліфікації кПЛР продуктів з праймерів на N- білок (зелені - світлі) та S-білок (сині-темні) на SARS-CoV-2 позитивних зразках

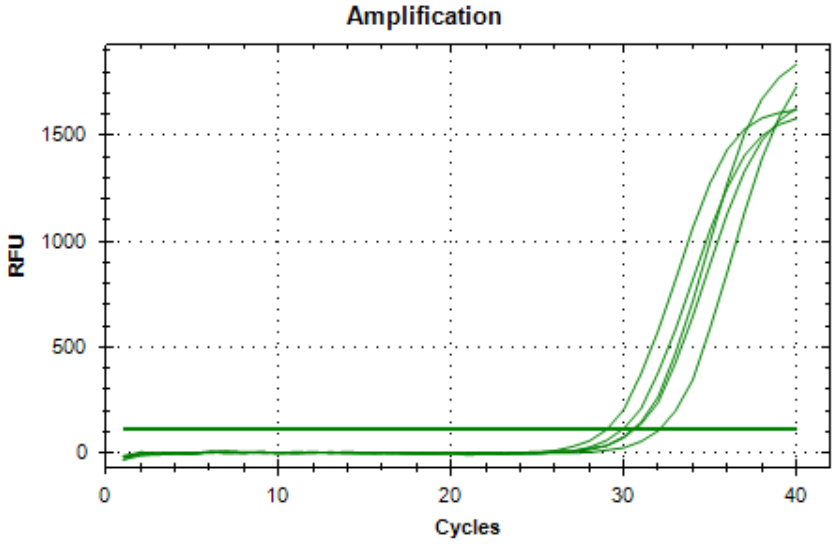
пояснити як тим, що деградація мРНК вірусу відбувається з 5’-кінця, де якраз ближче розташований S-білок, з однієї сторони. А з іншої, реплікація вірусу у заражених клітинах людини відбувається за допомогою вірусної ревертази навпаки з 3’-кінця, що може обумовлювати більшу кількість N-білка, який розташований ближче до цієї ділянки вірусу. Але ці припущення потребують подальших досліджень.

У попередньому етапі виконавцями відпрацьовано на референсному гені різні варіанти кПЛР детекції цього гена у зішкрібах як за допомогою стандартних методів з виділенням РНК, так і прямої детекції без виділення РНК.

У роботі було використано COVID-19–позитивні зразки, які були надані ЦГЗ МОЗ України, які були як свіжозамороженими та містили фізіологічний розчин та транспортне середовище, що інактивує вірус, але зберігає нуклеїнові кислоти, так і свіжі незаморожені зразки у середовищах. Для цих типів зразків було відпрацьовано пряму детекцію SARS-CoV-2 без виділення РНК як за допомогою однокрокової ПЛР з інтеркалюючим барвником Eva Green (Solis Biodyne), так і двокроковий кПЛР з інтеркалюючим барвником Eva Green з використанням Bst-полімерази у якості ревертази.

Перша група вірус-позитивних зразків, що була досліджена: свіжі зішкріби у транспортному середовищі. Для цих зразків було проведено пряме визначення SARS-CoV-2 без виділення РНК однокроковою кПЛР та двокроковою з використанням Bst-полімерази в якості ревертази (Рис. 11).

А



Б

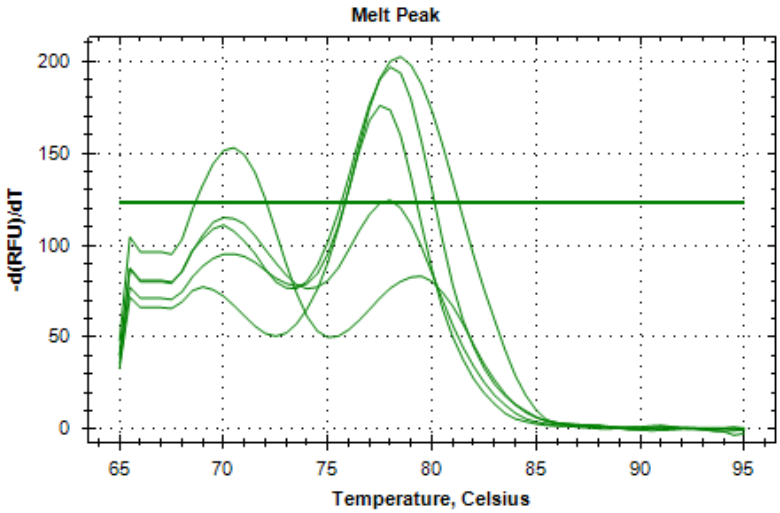


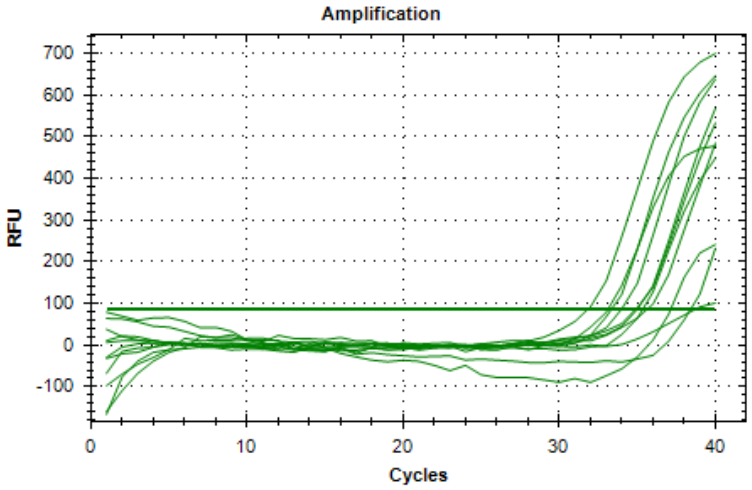
Рисунок 11. Криві ампліфікації (А) та плавлення (Б) продуктів двокрокової кПЛР з використанням Bst у якості ревертази з праймерів до N-білку при прямій детекції SARS-CoV-2 зі свіжих зразків у транспортному середовищі без виділення РНК

Слід відмітити, що у всіх випадках на кривих ампліфікації було виявлено продукти кПЛР, але криві плавлення у багатьох випадках показали наявність

неспецифічних продуктів реакції, чого не спостерігалось при стандартних аналізах з виділенням РНК.

Наступні зразки, що були досліджені – свіжо взяті зішкріби інактивовані у фізіологічному розчині. Пряме визначення вірусу без виділення РНК за допомогою однокрокової кПЛР (Рис. 12), двокрокової кПЛР з використанням Bst полімерази у якості ревертази (Рис. 13) з праймерів до N-білку також показали

А



Б

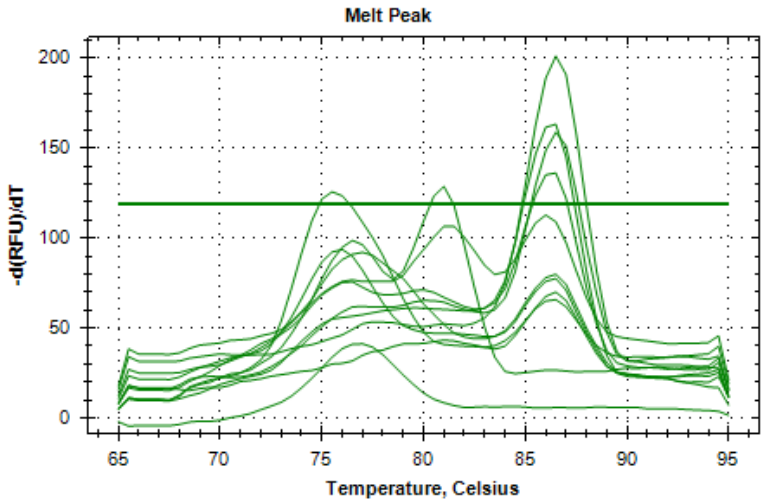
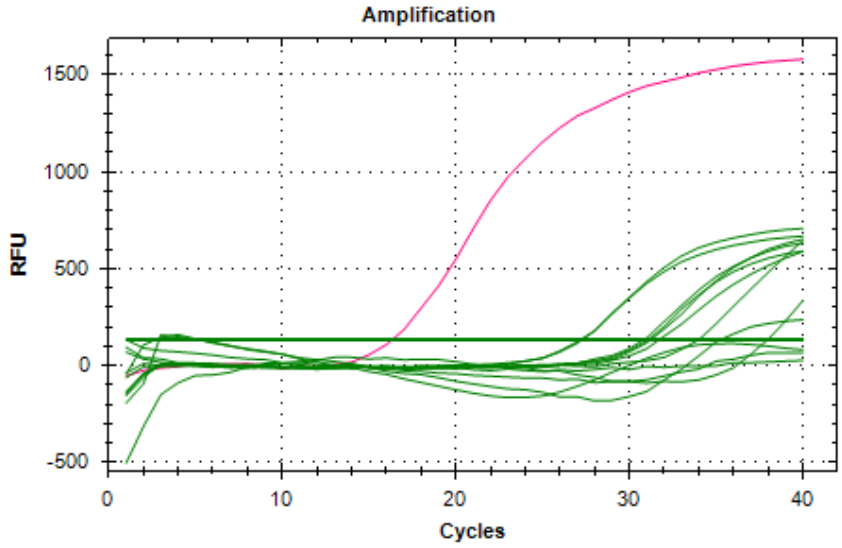


Рисунок 12. Криві ампліфікації (А) та плавлення (Б) продуктів однокрокової кПЛР з праймерів до N-білку при прямій детекції SARS-CoV-2 зі свіжих інактивованих зразків у фізіологічному розчині без виділення РНК

наявність кривих ампліфікації вірусу на різних циклах. Причому при використанні Bst-полімерази показники ампліфікації вірусу набагато гірші, ніж при одно крокові ПЛР, як і показники плавлення продуктів ПЛР.

А



Б

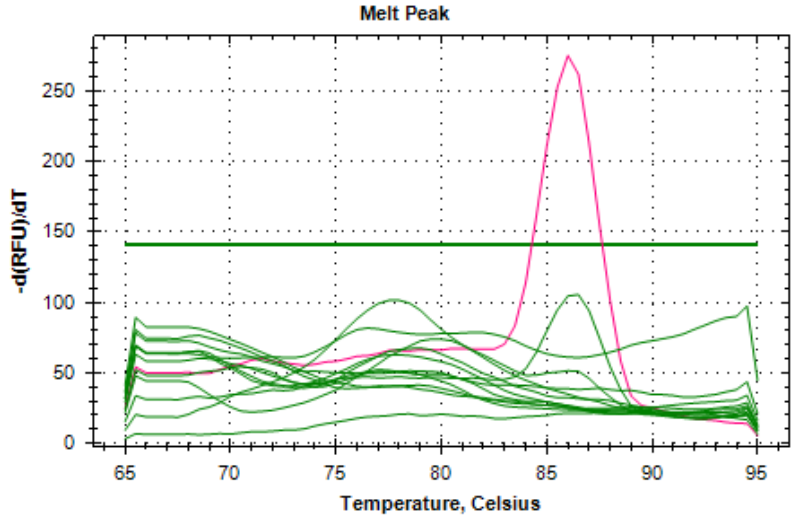
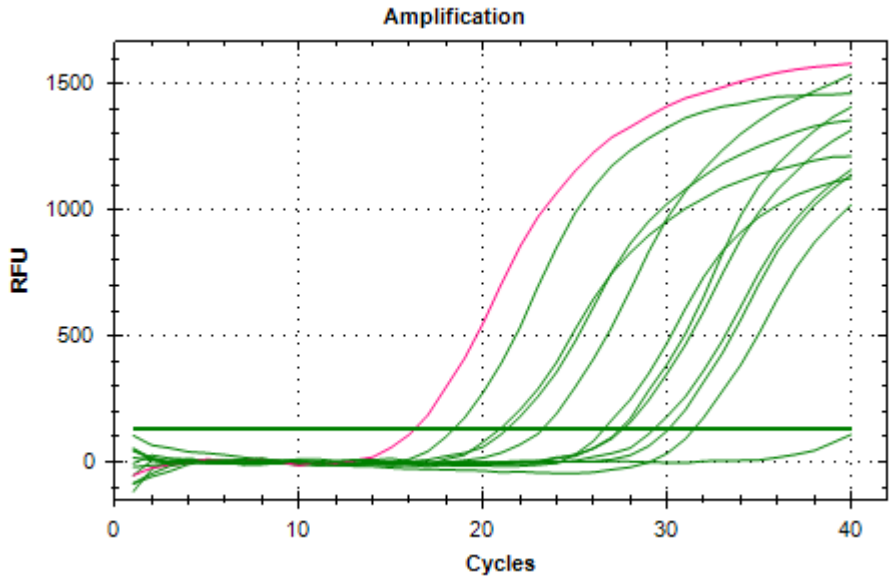


Рисунок 13. Криві ампліфікації (А) та плавлення (Б) продуктів двокрокової кПЛР з використанням Bst полімерази у якості ревертази з праймерів до N-білку при прямій детекції SARS-CoV-2 зі свіжих інактивованих зразків у фізіологічному розчині без виділення РНК: червоним – позитивний контроль

Можна припустити, що може у цих досліджуваних зразках низька кількість або погана якість вірусної РНК, але подальше виділення тотальної РНК і проведення кПЛР за стандартною методикою, яка опрацьована та показана нами раніше показала досить високий вміст вірусу у зразках, як і достатньо хорошу якість вірусної РНК (Рис. 14).

А



Б

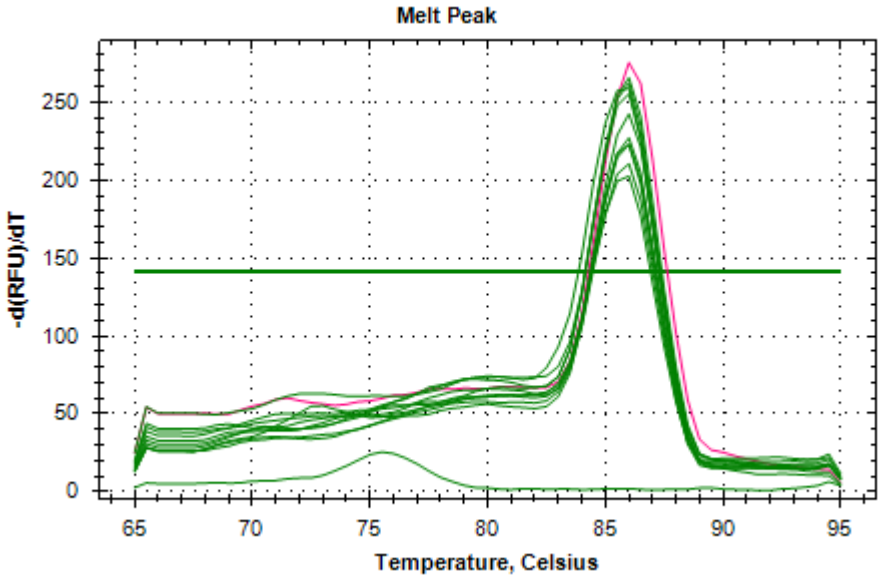


Рисунок 14. Криві ампліфікації (А) та плавлення (Б) продуктів двокрокової кПЛР за стандартною методикою з виділенням РНК з праймерів до N-білку при прямій детекції SARS-CoV-2 зі свіжих інактивованих зразків у фізіологічному розчині: червоним – позитивний контроль

Проведення дослідів на заморожених зразках у варіанті прямої детекції вірусу без виділення РНК показало наявність ще більшої кількості неспецифічих продуктів та зсуву циклів ампліфікації у бік погіршення результатів.

Отже, отримані результати свідчать про те, що необхідно подальше відпрацювання методу прямої детекції SARS-CoV-2 без виділення РНК у

біологічних зразках. Вірогідно низький рівень ампліфікації та наявність неспецифічних продуктів пов’язані з наявністю у зразках речовин, що інгібують ферменти, як ревертази, так і полімерази, що впливає на кінцевий результат аналізів. Усі підібрані праймери до N- та S-білка працюють ефективно у варіанті стандартної детекції SARS-CoV-2 з виділенням РНК як при однокроковій, так і двокроковій кПЛР.

5.2. Розробка ПЛР тестів з хроматографічною детекцією продуктів для визначення SARS-CoV-2

На попередньому етапі нами було відпрацьоване пряме визначення вірусу SARS-CoV-2 без виділення РНК за допомогою однокрокової кПЛР, двокрокової кПЛР з використанням ізотермічної BstIII-полімерази у якості ревертази з праймерів до N-білку. Причому при використанні BstIII-полімерази показники ампліфікації вірусу набагато гірші, ніж при одно кроковій ПЛР, як і показники плавлення продуктів ПЛР.

Отримані результати свідчать про те, що необхідно подальше відпрацювання методу прямої детекції SARS-CoV-2 без виділення РНК у біологічних зразках. Вірогідно низький рівень ампліфікації та наявність неспецифічних продуктів пов’язані з наявністю у зразках речовин, що інгібують ферменти, як ревертази, так і полімерази, що впливає на кінцевий результат аналізів. Усі підібрані праймери до N- та S-білка працюють ефективно у варіанті стандартної детекції SARS-CoV-2 з виділенням РНК як при однокроковій, так і двокроковій кПЛР. Слід відмітити, що використання тестів на основі одно крокової кПЛР хоч і є ефективним та більш легким у виконанні, але потребує складного та коштовного обладнання та дорогих реагентів.

Тому ми продовжили розробку більш дешевої та простої тест-системи для визначення вірусу SARS-CoV-2 на основі звичайного ПЛР та хроматографічної детекції продуктів реакції.

Відпрацьовані у попередній роботі праймери до N-білка вірусу SARS-CoV-2 та референтного гена людини beta-2-microglobulin (*B2M*) були помічені різними барвниками.

Прямі праймери до N-білка та *B2M* були помічені біотином. Зворотній праймер до N-білка – був мічений барвником FITC, а зворотній праймер до *B2M* був помічен барвником Digoxigenin (DIG). На хроматографічний папір наносили у різних місцях смужки антитіл до FITC та DIG. Отже на 3'- кінці ПЛР продукту N-білка знаходиться FITC, який специфічно зв'язується з імобілізованими антитілами на хроматографічному папері, а на 5'- кінці він мічений біотином, що дозволяє проводити його візуалізацію. ПЛР продукт гена *B2M* має на 3'- кінці DIG, який специфічно зв'язується з імобілізованими антитілами проти DIG на хроматографічному папері, а на 5'- кінці ПЛР продукт мічений біотином, що дозволяє проводити його візуалізацію.

Для відпрацювання системи спочатку проводили звичайний та кПЛР на відомих зразках з праймерами до N-білка вірусу SARS-CoV-2 та *B2M* у різних варіантах та відпрацьовували хроматографічну детекцію продуктів ПЛР за допомогою авідин-біотинової системи. Нами оптимізовано умови проведення ПЛР (5× HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus) на кДНК позитивних на SARS-CoV-2 зразків для детекції N-білка вірусу SARS-CoV-2 та *B2M*: 95° - 15 хв, (95° - 15 сек, 64° - 15 сек, 72° - 25 сек) 35 циклів. Результат наведено на Рис.15.

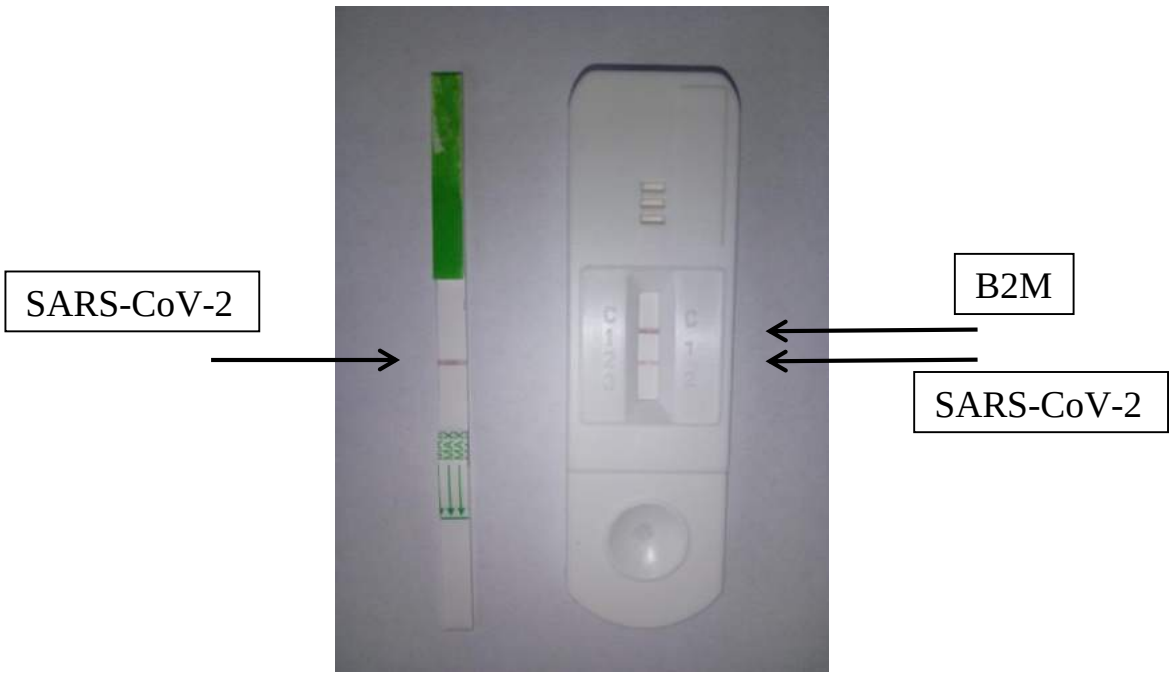


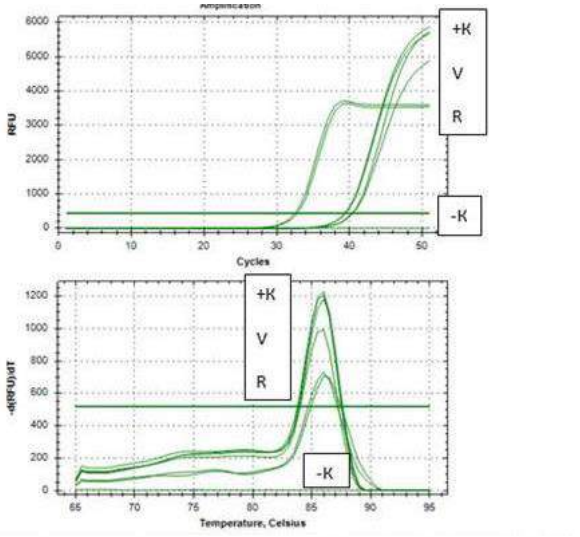
Рисунок 15. Приклад хроматографічної детекції N-білка вірусу SARS-CoV-2 та *B2M* у зразку, позитивному на SARS-CoV-2.

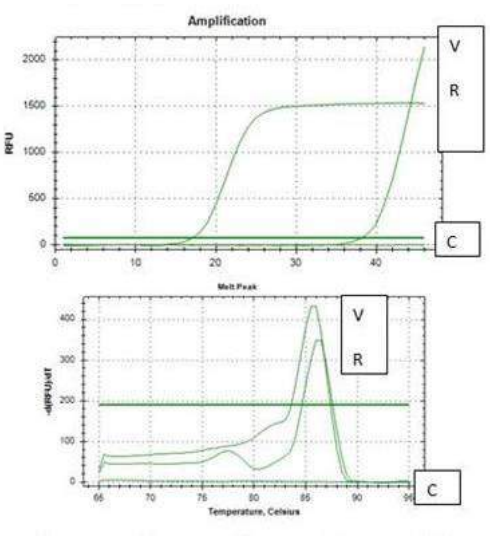
5.3. Створення комбінованої тест-системи для визначення вірусів SARS-CoV-2 й грипу А та Б

Враховуючи той факт, що багато респіраторних інфекцій мають схожі симптоми у пацієнтів та можливість розвитку конфекцій у ослаблених первинною інфекцією організмах хворих, дуже актуальним є своєчасна діагностика типу інфекції, що можливо завдяки розробці комбінованих ПЛР тест-систем для одночасного визначення декількох типів вірусу. Зокрема найбільш розповсюдженими вірусними інфекціями поряд з COVID-19 є сезонні піки захворювання на грип. Тому ми пропонуємо одну з комбінованих тест систем – саме для визначення вірусів SARS-CoV-2 та грипу А та Б. Нами було відпрацьовано роботу праймерів для детекції зазначених вірусів на сумішах з інтеркалюючим барвником Eva Green та позитивних на досліджувані віруси зразках (Рис. 16), що додатково підтверджено секвенуванням (Рис. 17).

Слід зазначити, що кожна пара праймерів працює специфічно та не відпалюється на зразках, що містять інші віруси.

А Б





+К – позитивний контроль
V – зразок пацієнта з праймерами на вірус
R - зразок пацієнта з праймерами на референсний ген
-К – негативний контроль

V – зразок пацієнта з праймерами на віруси грипа
R - зразок пацієнта з праймерами на референсний ген
С зразок пацієнта з праймерами на COVID-19

Рисунок 16. Детекція вірусу SARS-CoV-2 (А) та вірусів грипу А та Б (Б) методом кПЛР, криві ампліфікації продуктів

А Б

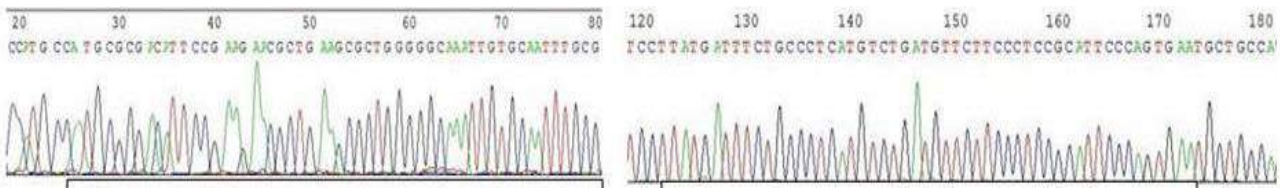


Рисунок 17. Хроматограми фрагментів вірусу SARS-CoV-2 (А) та вірусу грипу А (Б) з ПЛР продуктів, що були ампліфіковані зі зразків хворих на COVID-19 та грип.

Секвенування за Сенгером підтвердило наявність тих послідовностей вірусів SARS-CoV-2 (А) та грипу, до яких було підібрано праймери. На кривих ампліфікації неспецифічних продуктів не виявлено, що свідчить як про адекватну роботу праймерів та правильно підібрані умови ПЛР реакцій для тестування.

5.4. Створення комбінованої тест-системи для визначення респіраторних вірусів

Модельні розрахунки теперішньої пандемії на COVID-19 свідчать про велику загрозу ймовірної коінфекції віруса SARS-CoV2 і епідемічних штамів грипу, кору, паратгрипу і інш. Тому створення комбінованих тест-систем, які зможуть одночасно ідентифікувати декілька вірусних чинників таких коінфекцій є дуже актуальним.

Нами вже підібрано праймери до вірусів епідемічного грипу (А та Б), вірусів парагрипу 1-3 (Parainfluenza viruses 1-3), респіраторно-синцитіальних вірусів А і В та ортопневмовірусів людини (Orthopneumovirus A2, B1), риновірусів (Rhinovirus A (3D), вірус кіру (Measles virus D8, B3). Всі ці віруси є основою для запропонованої нами комбінованої тест-системи для діагностики вірусів при ГРВІ на основі кПЛР з використанням інтеркалюючого барвника типу EvaGreen (5× HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus) (Рис. 18).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sample 1 ACT	Sample 2 ACT	Sample 3 ACT	Sample 4 ACT	Sample 5 ACT	Sample 6 ACT	Sample 7 ACT	Sample 8 ACT	Sample 9 ACT	Sample 10 ACT		НК ACT
B	Sample 1 COVID	Sample 2 COVID	Sample 3 COVID	Sample 4 COVID	Sample 5 COVID	Sample 6 COVID	Sample 7 COVID	Sample 8 COVID	Sample 9 COVID	Sample 10 COVID	ПК COVID	НК COVID
C	Sample 1 flu	Sample 2 flu	Sample 3 flu	Sample 4 flu	Sample 5 flu	Sample 6 flu	Sample 7 flu	Sample 8 flu	Sample 9 flu	Sample 10 flu	ПК flu	НК flu
D	Sample 1 Praflu2	Sample 2 Praflu2	Sample 3 Praflu2	Sample 4 Praflu2	Sample 5 Praflu2	Sample 6 Praflu2	Sample 7 Praflu 2	Sample 8 Praflu 2	Sample 9 Praflu 2	Sample 10 Praflu 2	ПК Praflu 2	НК Praflu 2
E	Sample 1 Praflu3	Sample 2 Praflu3	Sample 3 Praflu3	Sample 4 Praflu3	Sample 5 Praflu3	Sample 6 Praflu3	Sample 7 Praflu 3	Sample 8 Praflu 3	Sample 9 Praflu 3	Sample 10 Praflu 3	ПК Praflu 3	НК Praflu 3
F	Sample 1 HRV	Sample 2 HRV	Sample 3 HRV	Sample 4 HRV	Sample 5 HRV	Sample 6 HRV	Sample 7 HRV	Sample 8 HRV	Sample 9 HRV	Sample 10 HRV	ПК HRV	НК HRV
G	Sample 1 HRSV	Sample 2 HRSV	Sample 3 HRSV	Sample 4 HRSV	Sample 5 HRSV	Sample 6 HRSV	Sample 7 HRSV	Sample 8 HRSV	Sample 9 HRSV	Sample 10 HRSV	ПК HRSV	НК HRSV
H	Sample 1 MVDS	Sample 2 MVDS	Sample 3 MVDS	Sample 4 MVDS	Sample 5 MVDS	Sample 6 MVDS	Sample 7 MVDS	Sample 8 MVDS	Sample 9 MVDS	Sample 10 MVDS	ПК MVDS	НК MVDS

Рисунок 18. Приклад розташування на плашці зразків та праймерів для комбінованої тест-системи з детекції семи респіраторних вірусів, одного референтного гена у якості контролю для 10-и досліджуваних зразків хворих на ГРВІ.

Примітка: Віруси: *SARS-CoV-2 (COVID), коронавірус; Influenza A or B (flu), грип; Parfinfluenza 2(Praflu2), парагрип 2; Parfinfluenza 3(Praflu3), парагрип3; Human Rhinovirus (HRV), риновірус; Human respiratory syncytial virus (HRSV), респіраторно сенсіальний вірусус; Measles virus genotype D8 (MVD8), вірус кору;* Внутрішній контроль: *АСТ;* ПК – позитивний контроль; НК – негативний контроль.

Для проведення цього аналізу необхідно стандартним методом виділити РНК зі зразків та синтезувати кДНК. Ці проби кДНК і є матрицею для аналізу. Виходячи з наявності на плашці 96 зразків, ми пропонуємо базову платформу для детекції 7-и респіраторних вірусів, людського референтного гена у якості контролю з можливістю розширення переліку вірусів та маркерних генів. При необхідності підтвердження результатів кПЛР можливе таргетне секвенування ампліфікованих продуктів. Одночасно на цій плашці можлива детекція 10-и зразків.

РОЗДІЛ 6. ПРОВЕДЕННЯ ДІАГНОСТИКИ НА ДОСТАТНІХ КЛІНІЧНИХ ВИБІРКАХ ТА ОТРИМАННЯ СТАТИСТИЧНО ЗНАЧУЩИХ РЕЗУЛЬТАТІВ ДЛЯ РОЗРОБКИ ТЕСТ-СИСТЕМ ТА ЇХ ВАЛІДАЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯМ ПОДВІЙНОГО СЛІПОГО МЕТОДУ

6.1. Валідація тест-систем на «невідомих» зразках для встановлення специфічності та чутливості тесту (додатковий набір біологічних зразків) та встановлення наявності вірусу SARS-CoV-2 методом ПЛР з хроматографічною детекцією.

Для валідації двокрокової тест-системи для детекції наявності вірусу SARS-CoV-2 методом ПЛР з хроматографічною детекцією нами було отримано 81 зразків зішкрібів у транспортному середовищі, що інактивує патогени, але зберігає біологічний матеріал вірусного та бактеріального походження. З цих відпрацьованими та описаними нами раніше методами біло виділено тотальну РНК та синтезовано кДНК. На отриманих зразках по оптимізованому протоколу було проведено ПЛР реакції та хроматографічну детекцію. Приклад наведено на Рис. 19. З 81 представленого зразка – 75 зразків виявились позитивними на SARS-CoV-2, та 6 – негативними на SARS-CoV-2.

Наступним кроком нами була проведена валідація отриманих «сліпим» методом результатів за допомогою кількісної ПЛР у реальному часі та секвенуванням нового покоління для встановлення генотипів вірусів SARS-CoV-2 з метою отримання інформації щодо стабільності роботи праймерів у запропонованих нами тест-системах.

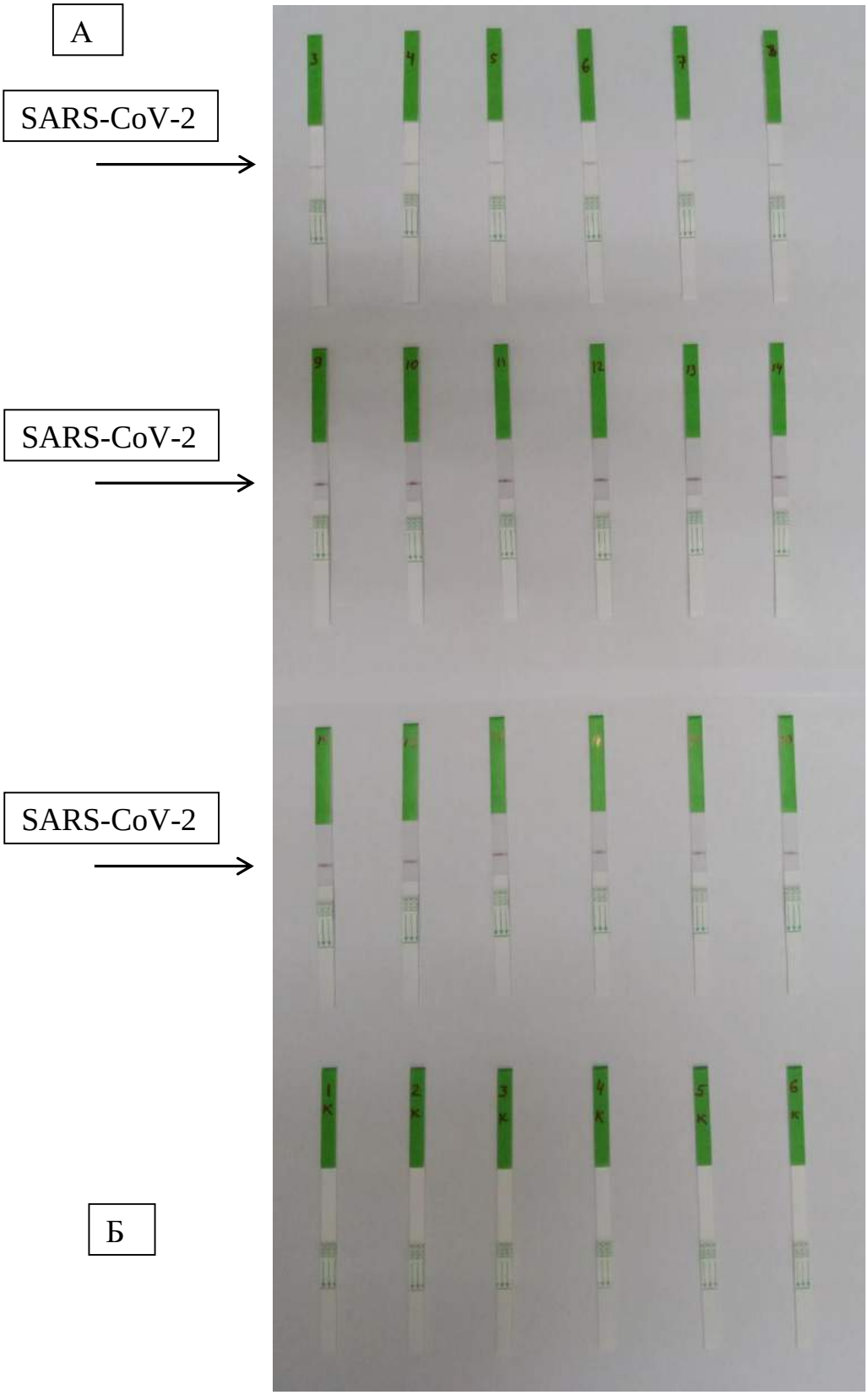


Рисунок 19. Приклад валідації двокрокової тест-системи для детекції наявності вірусу SARS-CoV-2 методом ПЛР з хроматографічною детекцією з 81 невідомого зразка: А – SARS-CoV-2 позитивні зразки; Б - SARS-CoV-2 негативні зразки.

6.2. Підтвердження результатів аналізу штамів вірусу SARS-CoV-2 кПЛР

Для підтвердження результатів аналізу штамів вірусу SARS-CoV-2 у проаналізованих зразках, було проведено кПЛР з флуоресцентним барвником EvaGreen (5×HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus). Результати валідації наведено на Рис.20. У 75 зразках підтверджено наявність вірусу SARS-CoV-2, що співпадає з методом ПЛР з хроматографічною детекцією.

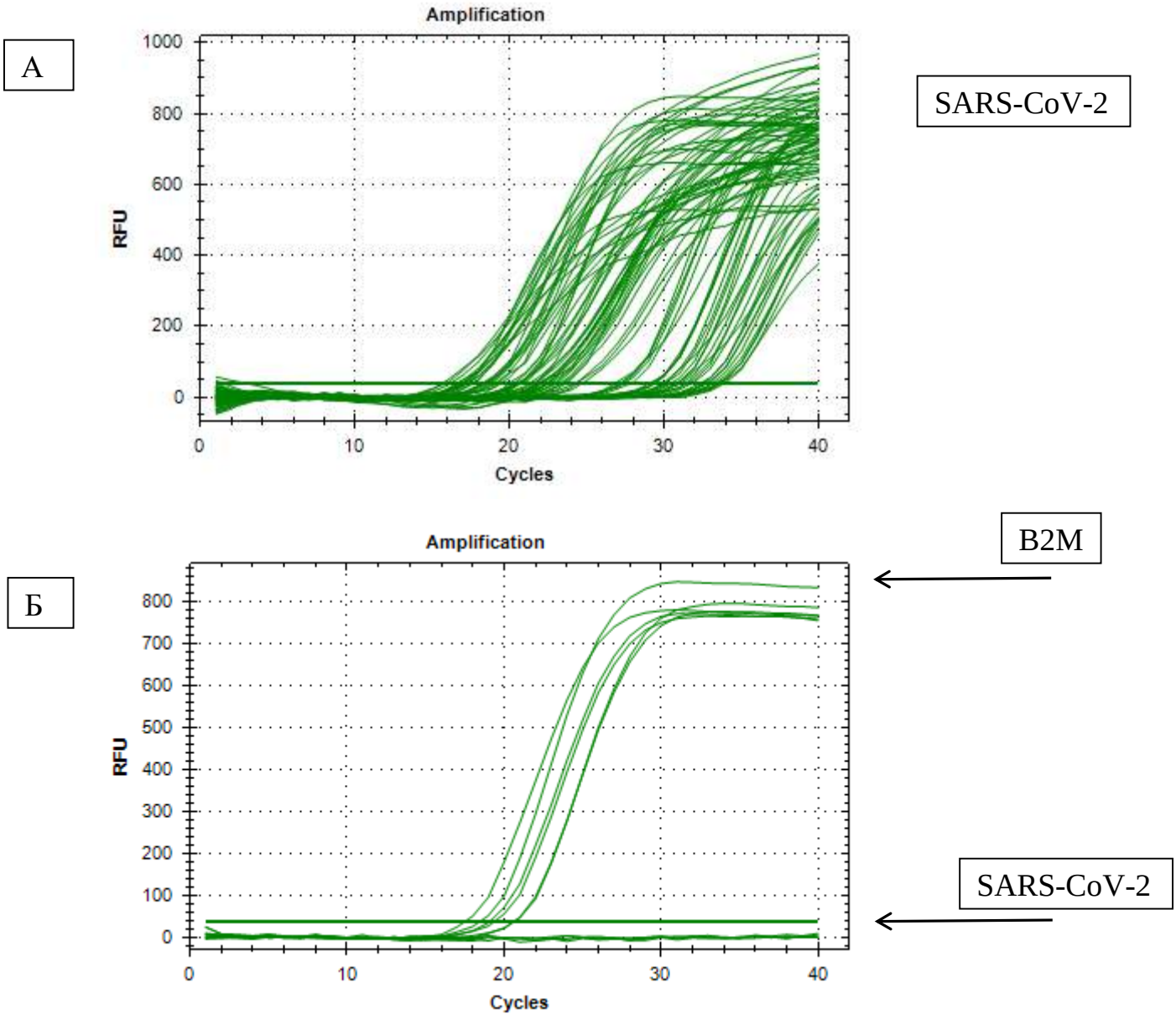


Рисунок 20. Приклад аналізу штамів вірусу SARS-CoV-2 методом кПЛР: А – 75 зразків, позитивних на SARS-CoV-2; Б – 6 зразків, негативних на SARS-CoV-2.

На рисунку 20Б – наведено також криві кПЛР референсного гена B2M, які підтверджують наявність РНК та проходження реакцій ПЛР на цих зразках.

Для більш точної валідації отриманих результатів на 75 позитивних на SARS-CoV-2 зразках було проведено повногеномне генотипування вірусу за допомогою секвенування нового покоління, що дозволяє не тільки детектувати вірус, але й його штам/варіант (дані наведено у Розділі 7). Результати секвенування зразків, позитивних на SARS-CoV-2 показали наявність в усіх зразках штаму Дельта у різних його варіантах.

Таким чином, валідація тест-системи на «невідомих» зразках показала високий рівень специфічності та чутливості тесту за методом ПЛР з хроматографічною детекцією та дозволила детектувати у 100% зразків наявність вірусу SARS-CoV-2.

РОЗДІЛ 7. ВИЗНАЧЕННЯ НУКЛЕОТИДНОЇ ПОСЛІДОВНОСТІ ГЕНОМІВ ШТАМІВ ВІРУСУ SARS-COV-2 ПОШИРЕНИХ В УКРАЇНІ

7.1. Підготовка зразків та відпрацювання умов для постановки секвенування нового покоління

Секвенування нового покоління є сучасним методом встановлення нуклеотидної послідовності, який потребує відпрацювання усіх етапів, починаючи з забору зразків та виділення вірусної РНК.

Для отримання високоякісної вірусної РНК зразки повинні бути зібрані у спеціальні пробірки, які містять розчини, вільні від РНКаз, інактивують сам вірус, але зберігають нуклеїнові кислоти вірусу.

Виділення загальної вірусної РНК проводили за допомогою набору для виділення ДНК вірусу/РНК (ZymoResearch, США), згідно протоколу виробника. Отримані зразки одразу ж заморожували на -70 ºС для зберігання або синтезували кДНК.

Синтез кДНК здійснювали з використанням SuperScript IV VILO Master Mix (INVITROGEN, США). Цей набір дає можливість отримувати високоякісну кДНК, яка підходить для даного методу. Встановлення якості отриманої кДНК проводили за допомогою розробленого нами тесту для кПЛР визначення SARS-CoV-2. Приклад відпрацювання виділення вірусної РНК, синтезу кДНК та проведення кПЛР аналізу досліджуваних зразків наведено на Рис. 21.

А Б

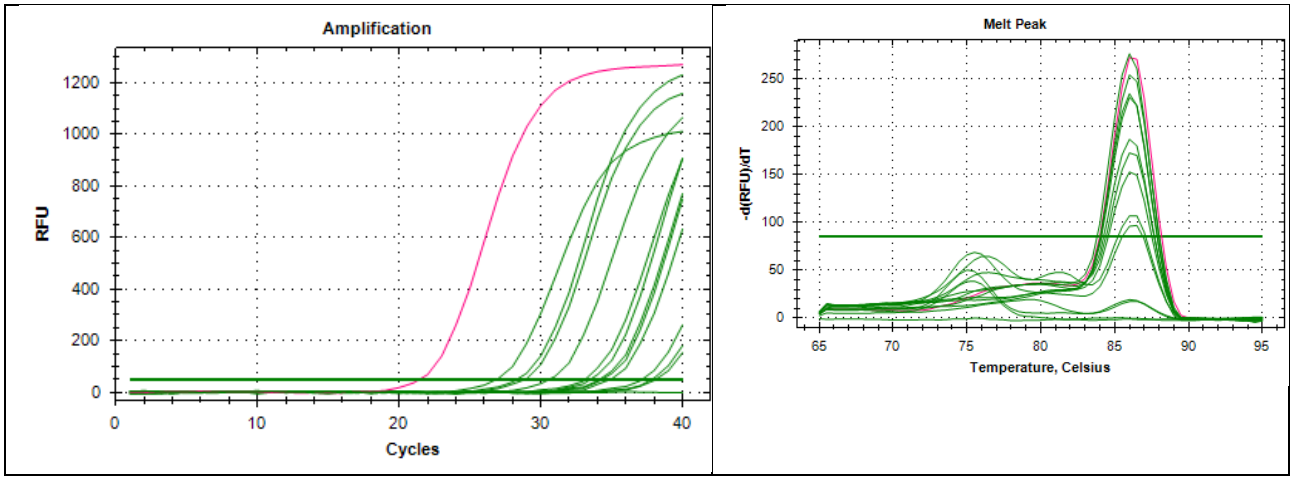


Рисунок 21. Приклад кривих ампліфікації (А) та плавлення (Б) кДНК

досліджуваних зразків (зелений колір) та позитивного контролю (червоний колір) для подальшого відпрацювання методу секвенування нового покоління

Відповідно до отриманих результатів кПЛР аналізу для досліджуваних проб буде підібрано режими наступної ампліфікації для отримання бібліотек досліджуваних зразків.

Цільові бібліотеки для секвенування були підготовлені за допомогою пулів праймерів 1 та 2, специфічних для SARS-CoV-2, з дослідницької панелі Ion AmpliSeq SARS-CoV-2 (Thermo Fisher Scientific, США), які містять більш ніж 400 пар праймерів.

Так, для зразків з Ct до 30 циклу – кількість циклів ампліфікації становить 16-17 – згідно з протоколом виробника, тоді як для зразків, що мають Ct 31-35 – це значення необхідно буде піднімати до 22-23 циклів.

Виходячи з отриманих даних кПЛР аналізу нами було скореговано по-перше кількість початкового матеріалу для аналізу та сконцентровано зразки вірусної РНК, що дало можливість отримати більш високі кількості кДНК, що у подальшому має велике значення для синтезу специфічних бібліотек для секвенування (Рис. 22).

А Б

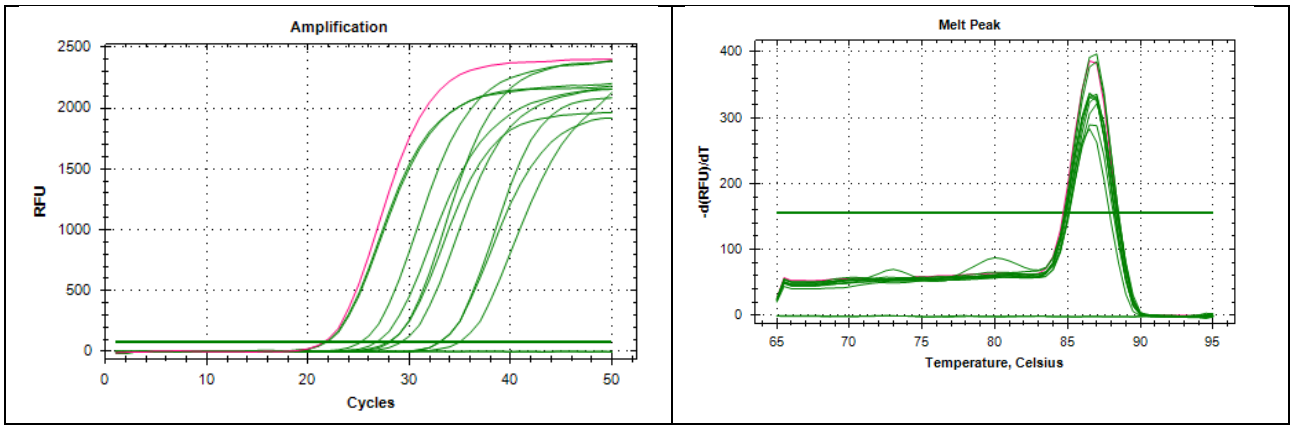


Рисунок 22. Приклад кривих ампліфікації (А) та плавлення (Б) кДНК досліджуваних зразків (зелений колір) та позитивного контролю (червоний колір) з концентрованих зразків вірусної РНК для подальшого відпрацювання методу секвенування нового покоління

Баркодування для зразків проводили за допомогою адаптерів Ion Xpress™ та бібліотечного комплекту Ion AmpliSeq 2.0 (Thermo Fisher Scientific, США), згідно рекомендацій виробника. Концентрацію бібліотек з баркодами визначали за допомогою набору для визначення кількостей іонних бібліотек TaqMan™ (Thermo Fisher Scientific, США). Бібліотеки розбавляли та об'єднували еквімолярно (140-150 мкм кожної). Емульсійну ПЛР проводили на приладі One Touch 2 (Thermo Fisher Scientific, США) з подальшим збагаченням та завантаженням на чіп Ion S5 530. Секвенування проводилося на системі Ion GeneStudio S5 Plus відповідно до протоколів виробника.

Біоінформатичний та статистичний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення Torrent Suite з використанням пакета дослідницьких плагінів SARS-CoV-2 v1.3.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Додатковий аналіз мутацій нуклеотидів та амінокислот, філогенезу та геномної епідеміології був проведений за допомогою ресурсів GISAID (www.gisaid.org) та Nextstrain SARS-CoV-2.

7.2. Скринінг зразків хворих на наявність вірусів та визначення нуклеотидної послідовності геномів низки поширених в Україні штамів вірусу SARS-CoV-2 у лютому-червні 2021 року

З початку пандемії у всьому світі активно розроблялися стратегії моніторингу мутацій SARS-CoV-2, щоб своєчасно реагувати на появу нових штамів. Ці стратегії включають оптимізацію повногеномного генотипування SARS-CoV-2 послідовності (NGS, Nanopore та інші) для виявлення варіантів вірусу у різних груп пацієнтів та масове цільове тестування (ПЛР, ІФА та ін.) населення для виявлення небезпечних мутацій SARS-CoV-2. Україна, будучи однією з найбільших країн Центральної Європи з високою мобільністю населення, перебуває під високим епідеміологічним ризиком пандемії COVID-19. До середини жовтня 2021 року в сусідніх країнах панував «британський штам» (лінія B.1.1.7), що спричинив третю хвилю спалаху COVID-19 в Європі.

Метою цього дослідження було виявити та охарактеризувати варіанти SARS-CoV-2, отримані з різних областей України під час нової хвилі спалаху COVID-19 у лютому 2021 року та червні 2021, з використанням повногеномного генотипування SARS-CoV-2 за допомогою секвенування нового покоління.

Зразки пацієнтів. Перший забір зразків було проведено 22 лютого 2021 року. Мазки з носоглотки були зібрані у 17 пацієнтів (у семи районах Івано-Франківської області) та двох зразків з Києва, зібраних Центром громадського здоров'я МОЗ України. Вибірка була відібрана відповідно до Гельсінської декларації та схвалена Міністерством охорони здоров'я України за погодженням з Центром громадського здоров'я. Етичне затвердження IMBG № 2/23.03.2021. Усі пацієнти були госпіталізовані з гострими респіраторними симптомами та мали позитивний результат на SARS-CoV-2 за допомогою специфічного тесту ПЛР в реальному часі. Була створена дослідницька група із випадково відібраних 17 зразків з Івано-Франківської області (8 жінок та 9 чоловіків; 8 пацієнтів були молодше 60 років) та 2 вибірки з Київської області (вік та стать невідомі).

Другий забір зразків було сформовано з різних регіонів України у травні-червні 2021 року Центром громадського здоров'я МОЗ України. Для дослідження було взято 11 назофарингеальних мазків у тому числі у пацієнтів, що мали незвичні симптоми та прояви COVID-19.

Відпрацювання усіх етапів повногеномного генотипування вірусу SARS-CoV-2 за допомогою методу секвенування нового покоління описано у попередньому підрозділі 7.1. Підготовка зразків та відпрацювання умов для постановки секвенування нового покоління.

Результати, отримані на зразках, що зібрані у лютому 2021 року як у Івано-Франківську, так і в Києві показали наявність на той час нового для України штаму SARS-CoV-2 - VOC202012/01 GRY (B.1.1.7, 20I/501Y.V1).

Примітно, що в 19 послідовних геномах SARS-CoV-2 було виявлено 47 різних місенс-мутацій у порівнянні з варіантом hCoV-19/Ухань/WIV04/2019 (Табл. 6). Крім основоположних мутацій 20I/501Y.V1 (EPI_ISL_581117), було виявлено ще кілька унікальних змін, включаючи зміни в S- та N-білках, які

можуть мати клінічне та епідеміологічне значення. Мутації, загальні для варіантів B.1.1.7 та окремі унікальні мутації, порівняно з еталонним геном коронавірусу Ухань, наведені в Таблиці 6.

Таблиця 6

Місенс мутації в B.1.1.7 та українських варіантах геному SARS-CoV-2 у порівнянні з референсним геномом hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019

Sample number	GISAD ID	Patient data			SARS-CoV-2 proteins with aa changes											
		Gender	Age	NSP2	NSP3	NSP5	NSP6	NSP9	NSP12	NSP13	NSP14	Spike protein	NS3	NS7a	NS8	N protein
20I 501Y.V1 B.1.1.7 **	EPI_ISL_581117 ***				T183I, A890D, I1412T		S106del, G107del, F108del	D78N#	P323L			H69del, V70del, Y144del, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H			Q27stop, R52I, Y73C	D3L, R203K, G204R, S235F
142627	EPI_ISL_1298474	F	Un	-	-	-	-	-	-	-	-	P621S	-	-	-	-
142706	EPI_ISL_1298480	M	70	-	-	-	-	-	-	-	A225V	-	-	-	-	-
142638	EPI_ISL_1298482	M	23	-	P822L	L75F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
142660	EPI_ISL_1298481	F	67	-	P153S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
142672	EPI_ISL_1298488	M	60	-	S1670F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
142701	EPI_ISL_1298484	M	45	-	-	-	-	-	-	-	-	T307I	-	-	-	-
142702	NA	M	45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
00008*	NA	Un	Un	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
142689	EPI_ISL_1298486	M	81	T634I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E106stop	-
142659	NA	F	45	gap	gap	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E106stop	-
142658	EPI_ISL_1298476	M	90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K68stop	G204P
142662	EPI_ISL_1298477	F	61	-	-	-	-	K84R	-	-	-	-	-	-	K68stop	G204P
142690	EPI_ISL_1298478	M	44	-	L72F	-	-	-	-	-	-	-	-	E16D	K68stop	G204P
142695	EPI_ISL_1298475	M	45		D226E	-	-	-	-	S74P	-	-	-	G38A	K68stop	G204P
142692	EPI_ISL_1298479	F	62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K68stop	G204P
142683	EPI_ISL_1298487	F	43	-	A861V	-	-	-	T912I	-	-	-	G172C	-	P30L, K68stop	G204P
142697	EPI_ISL_1298485	F	28	-	-	-	-	-	-	-	-	P807S	-	-	K68stop	G204P
142670	EPI_ISL_1298483	F	87	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K68stop	G204P
00010*	NA	Un	Un	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K68stop	G204P

Примітки: UN –невідомі; gap – втрата нуклеотидного сиквенсу; * - зразки з Києва; ** - спільні мутації для українських зразків та B.1.1.7 основного штаму, *** - основний штам B.1.1.7, 2020-09-21; Виявлено в лаюораторії: Lighthouse Lab in Milton Keynes; Submitting lab: Wellcome Sanger Institute for the COVID-19 Genomics UK (COG-UK) consortium; Автори: The Lighthouse Lab in Milton Keynes and Alex Alderton, Roberto Amato, Sonia Goncalves, Ewan Harrison, David K. Jackson, Ian Johnston, Dominic Kwiatkowski, Cordelia Langford, John Sillitoe on behalf of the Wellcome Sanger Institute COVID-19 Surveillance Team

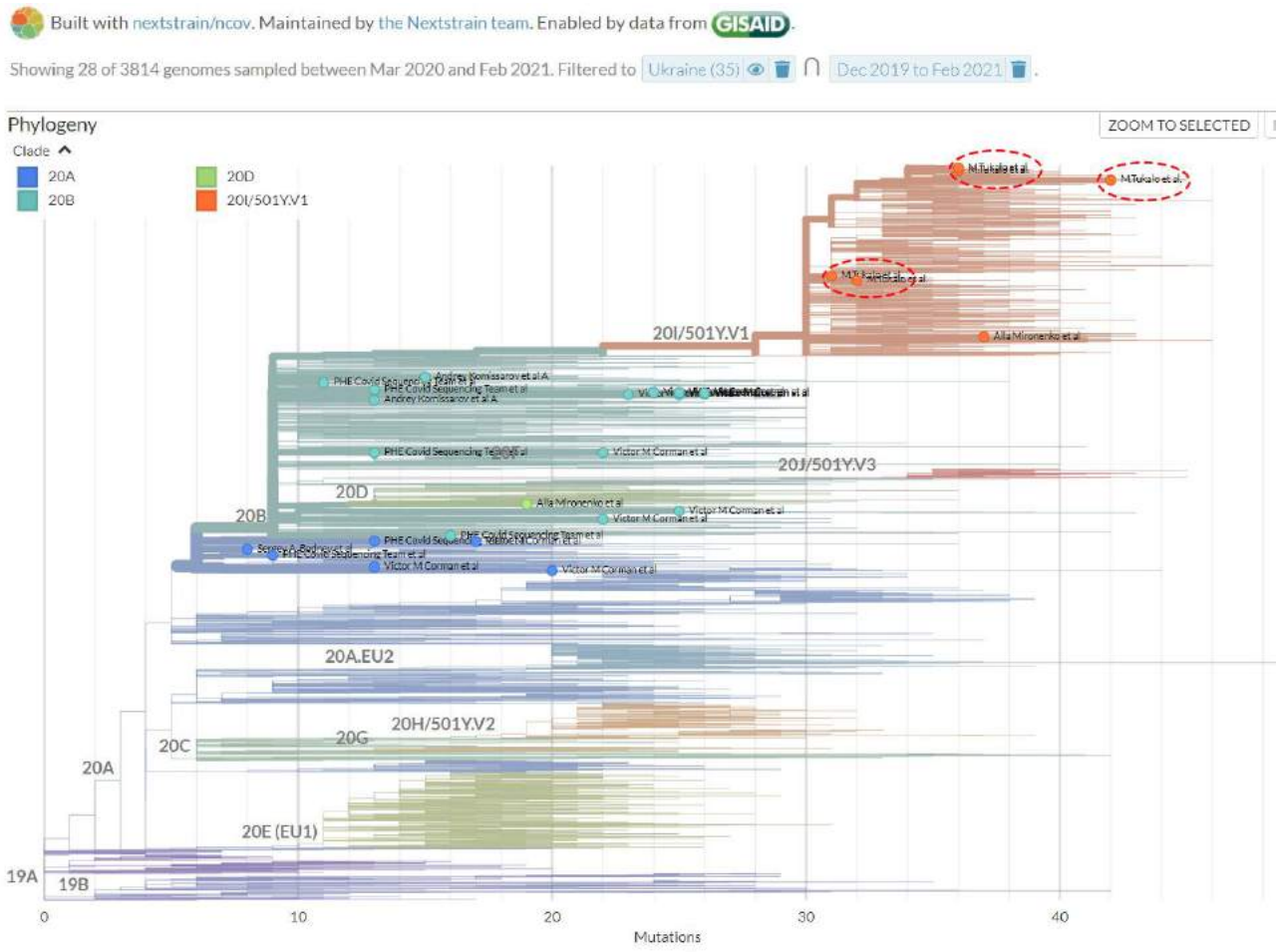
Найбільш клінічно значущою зміною у вивчених українських варіантах геному SARS-CoV-2 є мутація N501Y у шиповидному білку. Спочатку цей штам SARS-CoV-2 був виявлений у Великобританії більше року тому [6]. Ця мутація

пов'язана зі збільшенням поширення передачі та високою заразністю у всьому світі, що впливає на молодше населення, ніж попередні варіанти вірусу [17]. Усі геноми вірусу українських пацієнтів містили мутації - засновники в шиповидному та N -білках, загальні для варіантів B.1.1.7. За даними GISAID, найраніша повна геномна послідовність B.1.1.7 з високим охопленням була виявлена у Сполученому Королівстві (ID: EPI_ISL_581117). Ця послідовність містить усі основні місенс -мутації B.1.1.7 і має одну унікальну заміну в білку NSP9 (Таблиця 1). Варто відзначити, що геном EPI_ISL_581117 ще не містить безглуздих мутацій NS8_K68stop, а також 9 геномів України. Ця мутація була виявлена пізніше в послідовностях лінії B.1.1.7.

Слід зазначити, що в британському варіанті та у 10 українських зразках є більш рання мутація G204R у 204 залишку N-білка. Схоже, ці генотипи з’явилися раніше, отже, тепер можна було виявити різні незначні мутації, такі як P822L, P153S, S1670F у NSP3; L75F у NSP5; A225V в NSP14; T307I та P621S у S-білку та E106stop у NS8 білку. Таким чином, NS8_K68stop є однією з пізніших засновників мутацій. Важливо, що всі геноми вірусу України, які містили цю мутацію, також мали мутацію G204P у N-білку. У базі даних GISAID 2 із 55 послідовностей вірусів України з мутацією K68stop у білку NS8 також містили мутацію G204R, що вказує на їх більш раннє походження, ніж українські зразки з комбінацією мутацій NS8_K68stop та N_G204P. Отже, українські геноми SARS-Cov-2 лінії B.1.1.7 можна поділити на дві групи за часом походження: “старші” генотипи (10 зразків з 19 з мутацією N_G204R) та “молодші” (9 решта зразків). У «молодших» геномах був виявлений додатковий набір незначних мутацій (Табл. 6).

Результати порівняльного філогенетичного аналізу представлені на Рис. 23. Усі зразки в лінії B.1.1.7 містять більше 30 мутацій в одному геномі вірусу.

A



Б

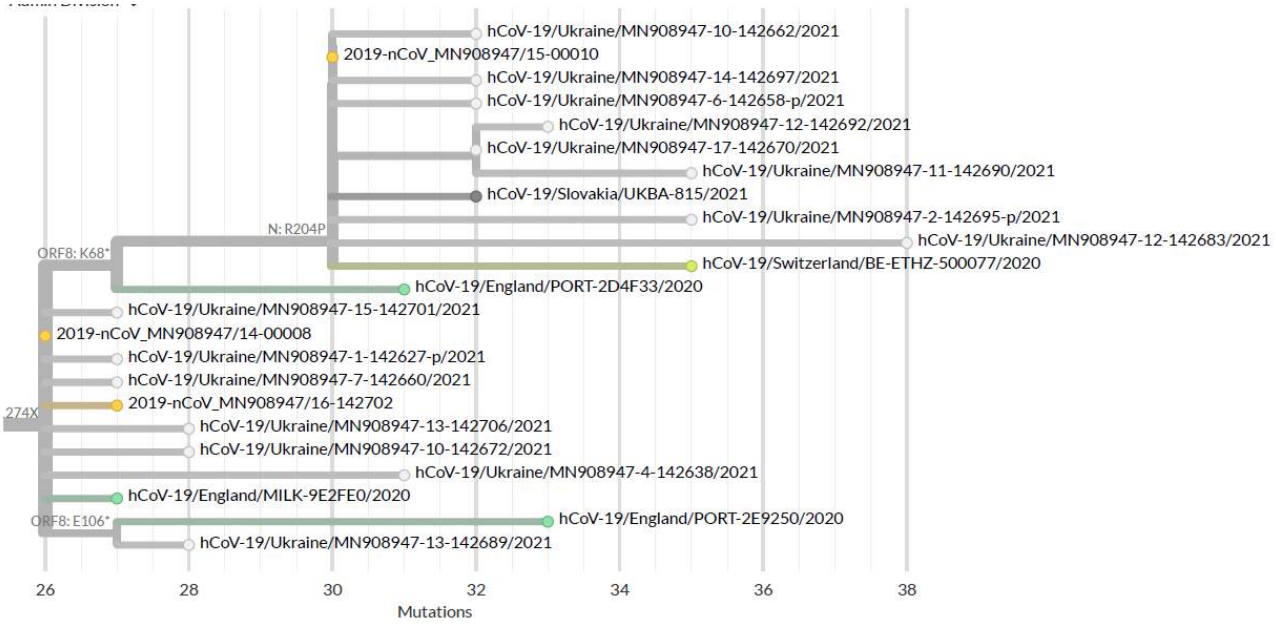


Рисунок 23. (А) Геномна епідеміологія SARS-Cov-2 в Європі - європейське філогенетичне дерево до кінця лютого (GISAID); українські зразки з поточного дослідження мають овали червоного кольору. (Б) Філогенетичне дерево

варіантів SARS-Cov-2-підвибірка, орієнтована на глобальне та поточне дослідження: зразки Івано-Франківська, завантажені до GISAID, позначені світло-сірим (поточне дослідження); не завантажені до GISAID зразки позначені помаранчевим кольором (поточне дослідження); еталонні референсні зразки від GISAID маркуються іншими кольорами.

Філогенетичний аналіз показав, що варіанти SARS-CoV-2 в українській досліджуваній групі мають різне походження. Їх можна розділити на два великі кластери, з комбінацією мутаційних NS8_K68stop та N_G204P та без них. Ці кластери можна додатково поділити на менші групи. У кластері геному, що містить комбінацію мутацій NS8_K68stop та N_G204P, три зразки належать до двох різних гілок. Таким чином, зразки 142690 та 142692 мають спільного предка (142670). Це підтверджує наше припущення, що варіанти B.1.1.7 циркулювали в Україні достатньо довго, щоб еволюціонувати від спільного "українського" предка.

У другому кластері зразок 142689 утворює гілку із референсним варіантом EPI_ISL_741706. В обох геномах є мутація NS8_E106, яка також присутня в українському зразку 142659 (ця послідовність була пропущена у філогенетичному аналізі через кілька прогалин у області гена NSP3). Важливо, що ця мутація (NS8_E106stop) також була присутня у геномі вірусу лінії 595 B.1.1.7 у GISAID, демонструючи інше походження, ніж інші варіанти B.1.1.7.

Підводячи підсумок, ми припускаємо, що в кінці лютого 2021 р. В Україні переважали варіанти SARS-CoV-2 лінії B.1.1.7, які відрізняються за походженням та часом виникнення, хоча виявлено в Україні лише в березні 2021 р. Крім того, ми припускаємо, що «британські варіанти» SARS-CoV-2 не потрапляли в Україну одночасно, оскільки вони мають повторюване походження.

Дані про секвенування геномів варіантів SARS-CoV-2 були завантажені в базу даних GISAID (www.gisaid.org) та опубліковані у роботі [18].

Завдяки цьому проекту дослідниками було вперше ідентифіковано появу Альфа варіанту B.1.1.7 SARS-CoV-2 в Україні та повідомлено про результати у РНБО України.

Зразки, які було отримано з різних регіонів України у травні-червні 2021 також було просеквеновано за описаною методикою. Так, з 11 SARS-CoV-2 позитивних зразків було ідентифіковано два варіанти коронавірусу: 7 зразків Альфа варіанту B.1.1.7 (VOC Alpha 202012/01 GRY), який спричинив дуже небезпечну хвилю захворювань у лютому-травні 2021 року, та 4 зразки вперше виявленого в Україні Дельта варіанту B.1.617.2 SARS-CoV-2 (VOC Delta G/478K.V1) (Табл. 7). Новий варіант вже на теперішні час заміщує попередні варіанти коронавірусу, зокрема у Великій Британії, США, багатьох країнах Європи та світу та за даними ВООЗ буде причиною нової хвилі COVID-19 по всьому світу. Слід зазначити, що цей варіант є дуже швидко розповсюджуваним та має властивості уникати імунної відповіді організму людини. Крім того, виявлено зниження ефективності існуючих вакцин проти Дельта варіанту SARS-CoV-2.

Таблиця 7

Клінічні дані та результати секвенування з виявлення штамів SARS-CoV-2 у зразках українських пацієнтів у травні-червні 2021 року

№	Код	Код зразка клінічний	Центр, де взято зразки	Місто, лікарня, де взято зразок	Дата взяття матеріалу	Стать	Вік	Штам SARS-CoV-2	Мутації у шиповидному білку
6	**HZ 8**	**62574**	ЦГЗ МОЗУ	Ужгород, Закарпатський ОЦКПХ МОЗУ	24.06. 2021	ж	85	**Дельта**	T19R(20) G142D E156G F157del R158del **L452R T478K** D614G S 680P(674) P681R(674) D950N
7	**F2**	**6**	КЦКЗ	Київ, КНП»ЦПМСД» №1 Дніпровського р-ну	15.06. 2021	ч	34	Альфа	H69del V70del(69) Y144del(143) F157L N501Y A570D D614G P6 81H(674) A701V T716I S982A D 1118H
9	**HZ 7**	**62573**	ЦГЗ МОЗУ	Ужгород, Закарпатський ОЦКПХ МОЗУ	24.06. 2021	ж	57	**Дельта**	T19R(20) F86I G142D E156G F1 57del R158del **L452R T478K** D6 14G P681R(674) D950N
10	**HZ 2**	**59758**	ЦГЗ МОЗУ	Херсон, ДУ Херсонськ.обл. лаб. центр МОЗУ	21.05. 2021	ж	32	Альфа	H69del V70del(69) Y144del(143) N501Y A570D D614G P681H(67 4) T716I S982A D1118H
11	**G2**		ЦГЗ МОЗУ	Київ, Олександрівська лікарня	18.06. 2021	ч	14	**Дельта**	T19R(20) F86I G142D E156G F1 57del R158del K356H R357Q S3 59C N360I V362L A363C D364d el Y365del S366del V367F **L452 R T478K** D614G P681R(674)
13	**F6**	**104**	КЦКЗ	Київ, КНП»ЦПМСД» №6, Печерського р-ну	14.06. 2021	ж	63	Альфа	H69del V70del(69) Y144del(143) T307I N501Y A570D D614G P68 1H(674) T716I S982A D1118H

14	**F1**	**3**	КЦКЗ	Київ, КНП»ЦПМСД» №1 Дніпровського р-ну	14.06. 2021	ч	51	Альфа	H69del V70del(69) Y144del(143) T307I N501Y A570D D614G P68 1H(674) T716I S982A D1118H
15	**F5**	**14**	КЦКЗ	Київ, КНП»ЦПМСД» №1 Голосіївського р-ну	15.06. 2021	ч	68	Альфа	T20I H69del V70del(69) Y144del (143) N501Y A570D D614G P68 1H(674) S704L T716I S982A D1 118H
16	**HZ 4**	**60454**	ЦГЗ МОЗУ	Суми, ДУ Сумський ОЛЦ МОЗУ	25.05. 2021	ж	26	Альфа	H69del V70del(69) Y144del(143) N501Y A570D D614G P681H(67 4) T716I S982A D1118H
17	**G1**		ЦГЗ МОЗУ	Київ, Олександрівська лікарня	18.06. 2021	ч	63	**Дельта**	T19R(20) G142D E156G F157del R158del **L452R T478K** D614G P 681R(674) D950N
18	**F10**	**234**	КЦКЗ	Київ, КНП»ЦПМСД» №2, Шевченківського р-ну	15.06. 2021	ж	55	Альфа	H69del V70del(69) Y144del(143) G181L N501Y A570D D614G P6 81H(674) T716I S982A D1118H

Шиповидний протеїн є одним з білків коронавірусу, що має найбільшу кількість мутацій у різних штамах SARS-CoV-2 та відповідає за зміну патогенних властивостей вірусу. На Рис. 24 представлені 3-D структури S-протеїнів Альфа та Дельта варіантів SARS-CoV-2 з відміченими місцями важливих мутацій, що змінюють як структуру цього білка, так і його властивості щодо взаємодії з рецепторами клітин людини. Тому подальше вивчення зміни структури та функцій, до яких призводить поява нових мутацій SARS-CoV-2 є дуже актуальною задачею як для фундаментальної науки, так і для практичної медицини.

А Б

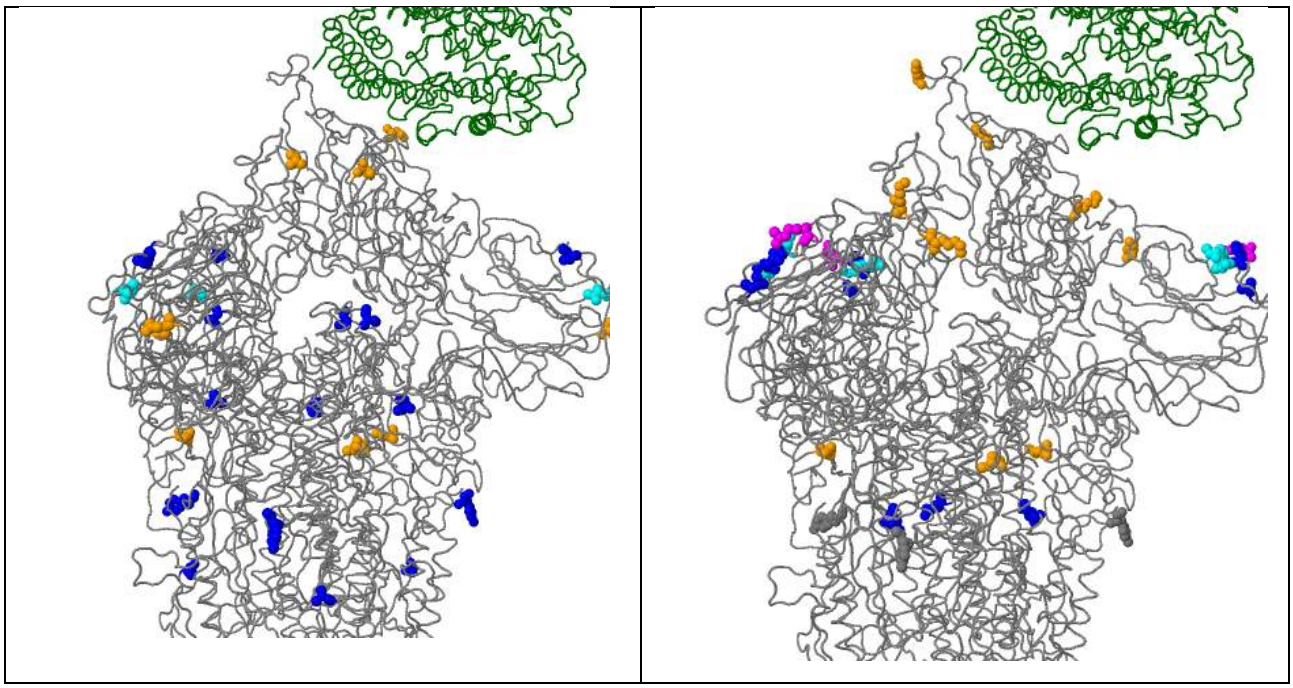


Рисунок 24. 3-D зображення особливостей будови S-протеїну Альфа варіанту (А) та Дельта варіанту (Б) SARS-CoV-2 (сірий колір) при взаємодії з

ACE2 рецептором клітин людини (зелений колір): різними кольорами відмічено патогенні мутації у коронавірусу, що призводять до посилення патогенних властивостей SARS-CoV-2

Слід відмітити, що й на цей раз дослідникам вперше вдалось ідентифікувати новий небезпечний штам коронавірусу в Україні - Дельта варіант, що дозволило керівництву країни вчасно вжити заходів щодо зниження розповсюдження SARS-CoV-2 та проінформувати медичну систему для підготовки до нової хвилі пандемії в Україні.

7.3. Скринінг зразків хворих на наявність вірусів та визначення геномів низки штамів вірусу SARS-CoV-2 поширених в Україні у липні – жовтні 2021 року

Одним з важливих завдань проєкту для розробки ефективних тестів на ОНВІ є моніторинг особливостей вірусів, які поширені саме на території України. Це дає можливість впевнитись, що запропоновані тест-системи для детекції SARS-CoV-2 є робочими та адекватно оцінюють наявність досліджуваного вірусу і праймери не містять мутацій у нових варіантах та штамах, які з'являються в країні.

В період з лютого 2021 до жовтня 2021 року учасниками проєкту було проаналізовано за допомогою NGS 234 зразки РНК вірусу SARS-CoV-2, виділеного з назофарингеального епітелію хворих на ковід-19 з різних регіонів України, віком від 5 місяців до 85 років, переважна більшість пацієнтів госпіталізовані з середньою та важкою формою ковіду-19 (95,6%), для решти хворих даних про госпіталізацію немає. Зразки надано ЦГЗ МОЗ України (Рис.25 та Рис.26):

- **лютий 2021** – 19 зразків (17 зразків з Івано-Франківської області (Івано-Франківськ, Надвірна, Тисмениця, Косов, Калуш, Богородчани, Бруштин) та 2 зразки з м. Києва – опубліковані (Kashuba et al. Biopol Cell, 2021)

- **червень 2021** – 11 зразків (Київська обл. – 7; Закарпатська– 2; Херсонська – 1; Сумська – 1).
- **липень-серпень 2021 -** 54 зразки (Черкаська обл. – 4; Дніпропетровська – 5; Херсонська – 4; Хмельницька – 6; Київська – 10; Волинська – 7; Донецька – 4; Миколаївська – 1; Одеська – 6; Полтавська – 5; Рівненська – 2).
- **вересень 2021** – 75 зразків (Черкаська – 5; Чернівецька – 1; Івано-Франківська – 13; Київська -1; Львівська – 7; Полтавська – 9; Рівненська – 6; Луганська – 27; Тернопільська – 4; Запорізька - 2)
- **жовтень 2021** – 75 зразків (Дніпропетровська – 10; Харківська – 8; Херсонська – 10; Київська – 9; Волинська – 9; Львівська – 9; Одеська – 10; Закарпатська– 10)

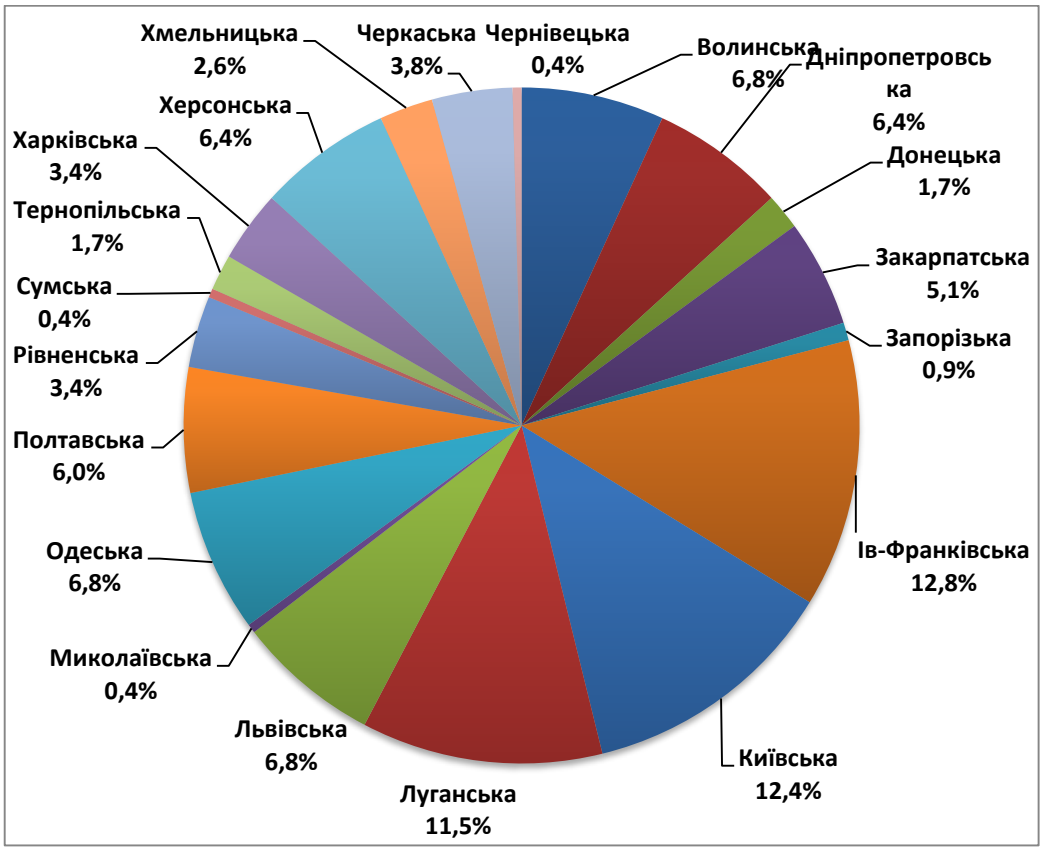


Рисунок 25. Діаграма розподілу за областями України 234 зразків, які аналізували з використанням повногеномного NGS послідовності віруса SARS-CoV-2

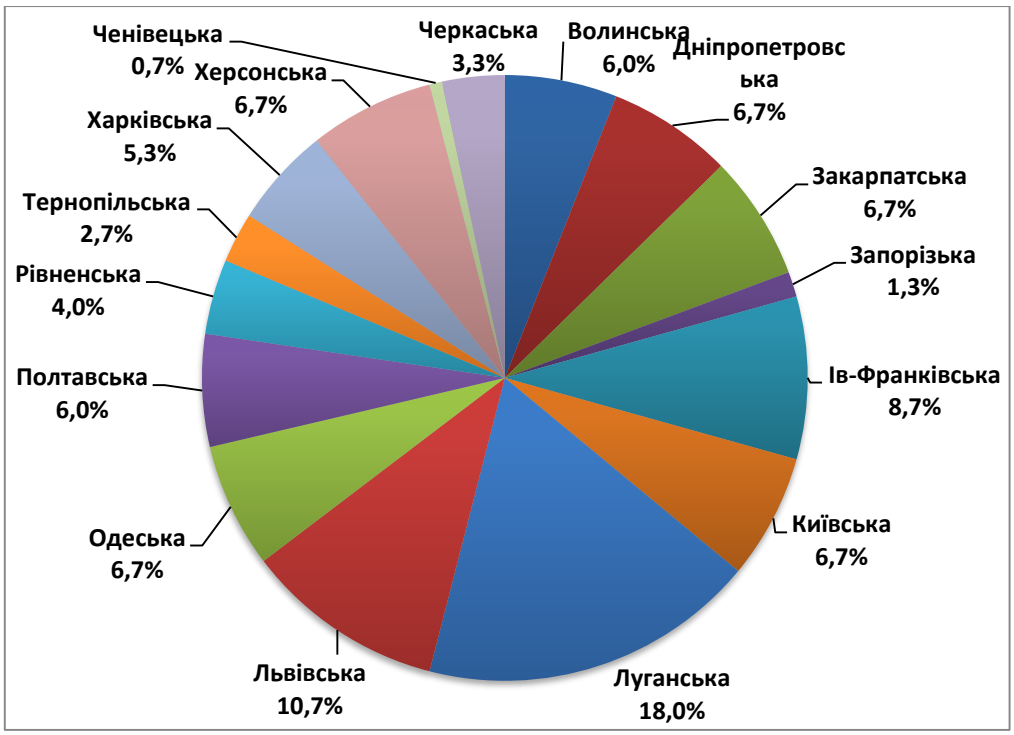
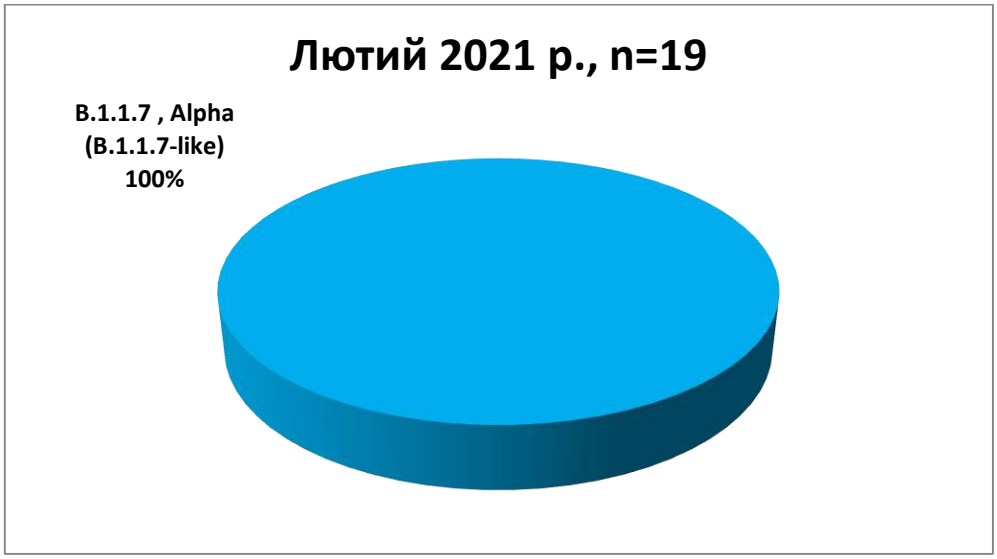


Рисунок 26. Географія зразків штаму Delta, які аналізували з використанням повногеномного NGS під час осінньої хвилі пандемії в Україні (вересень-жовтень 2021 р.)

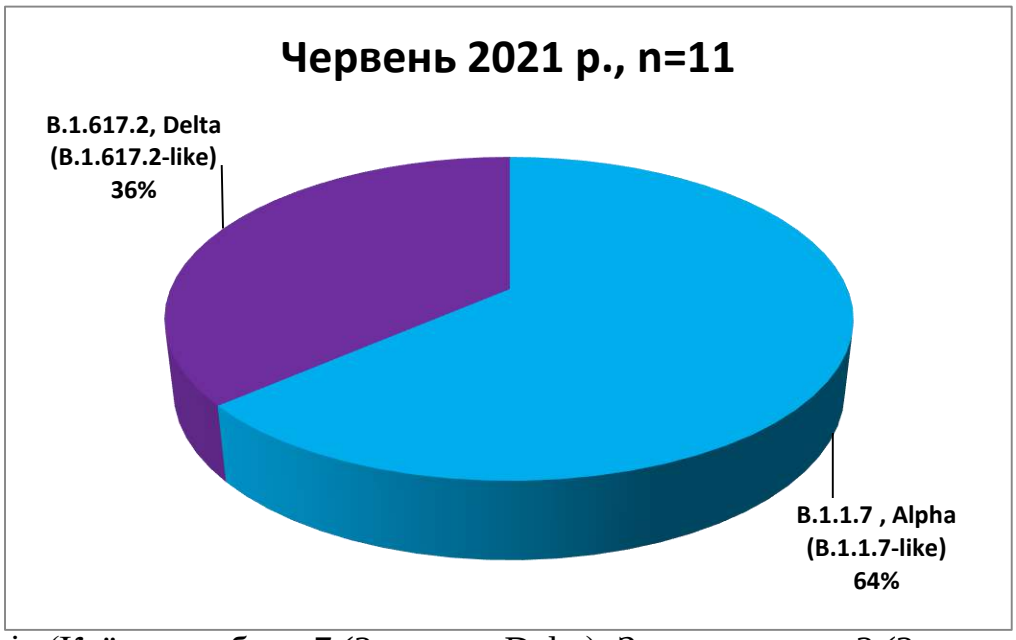
Для всіх проаналізованих зразків визначено штам вірусу. Розподіл зразків за штамами представлено на рис.27 А-Д.

А



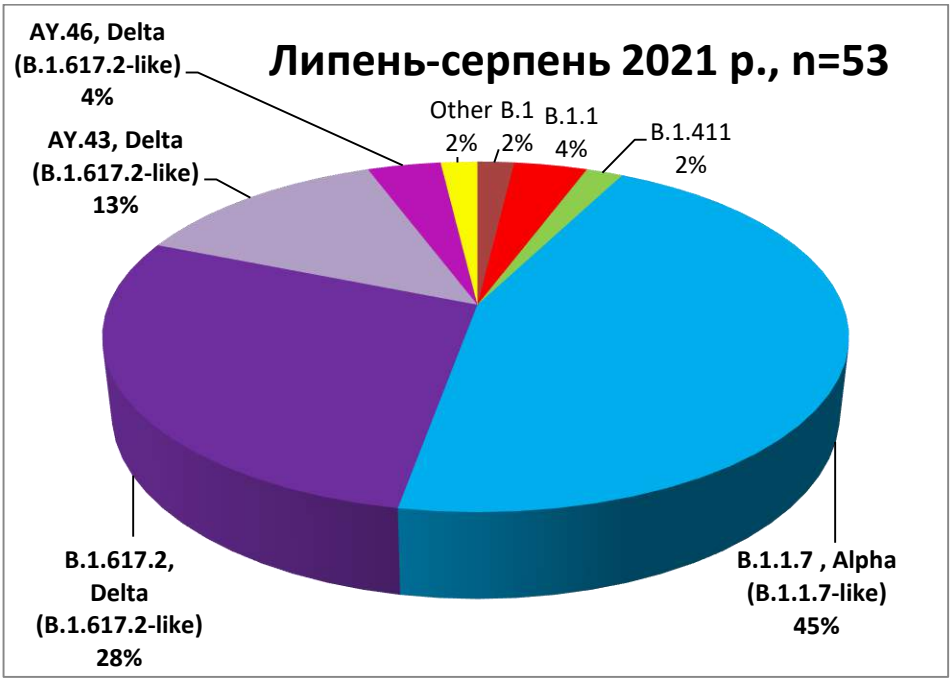
19 зразків (17 зразків з Івано-Франківської області (Івано-Франківськ, Надвірна, Тисмениця, Косов, Калуш, Богородчани, Бруштин) та 2 зразки з м. Києва. Частота штаму Alpha 1.00; 95%ДІ: 0.824-1.000

Б



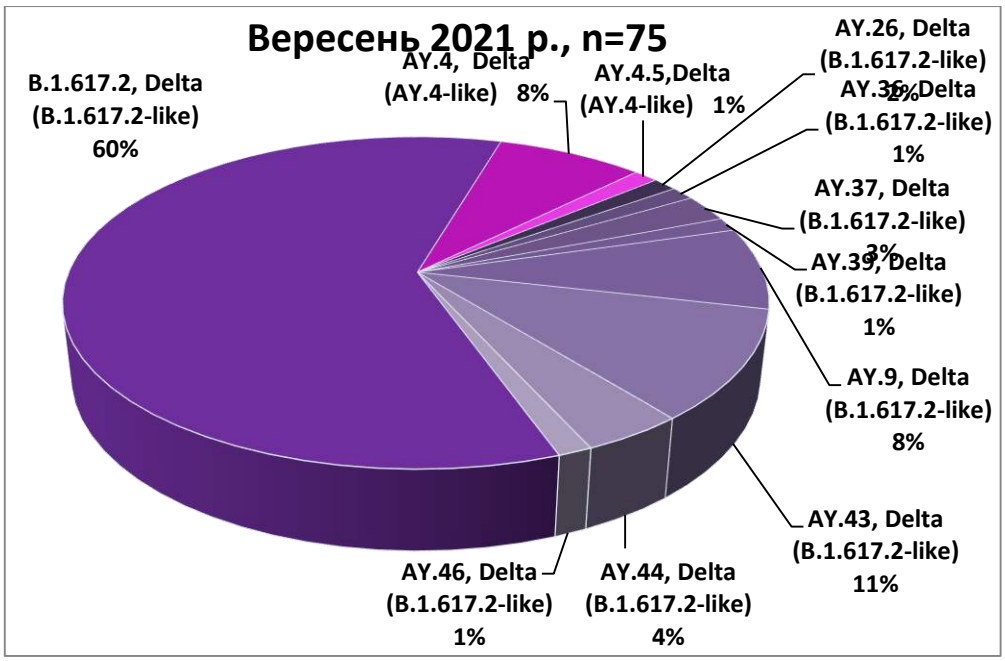
11 зразків (Київська обл. – 7 (2 – штам Delta); Закарпатська– 2 (2 – штам Delta); Херсонська – 1; Сумська – 1); Частота штаму Alpha 0.64; 95% ДІ: 0.308-0.891; Частота штаму Delta 0.36; 95% ДІ: 0.109-0.692

В



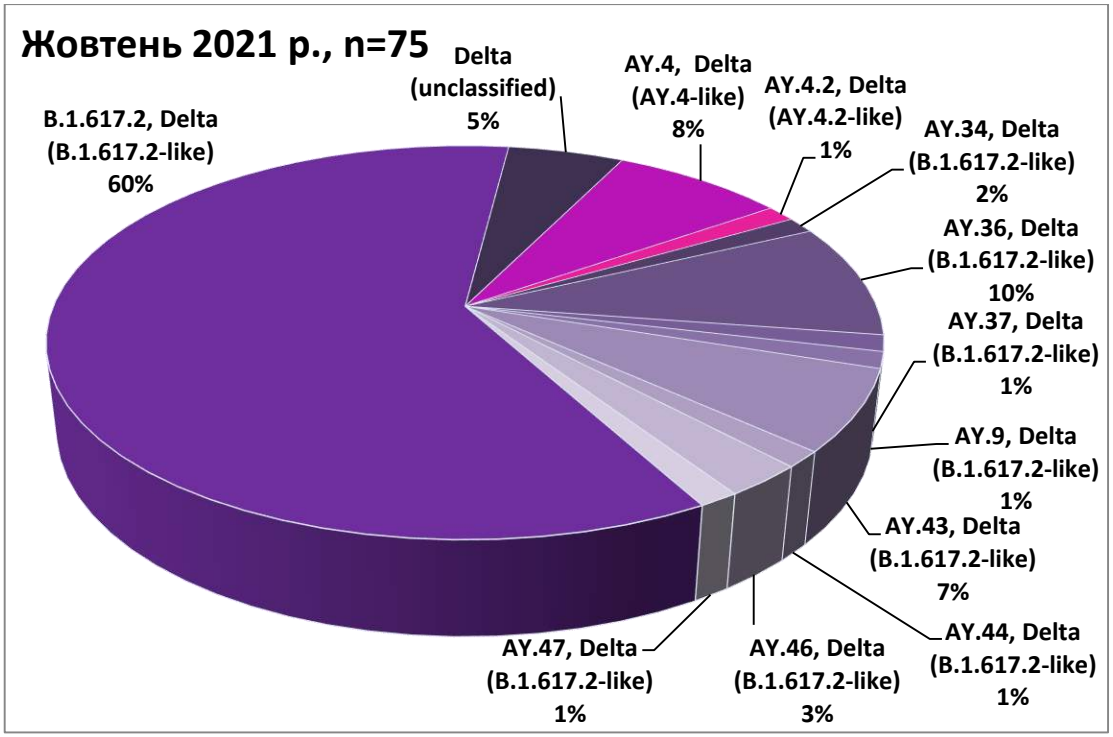
54 зразки (Черкаська обл. – 4; Дніпропетровська – 5 (3 – штам Delta); Херсонська – 4 (2 – штам Delta); Хмельницька – 6 (1 – штам Delta); Київська – 10 (8 – штам Delta); Волинська – 7 (7 – штам Delta); Донецька – 4; Миколаївська – 1; Одеська – 6 (2 – штам Delta); Полта вська – 5 (1 – штам Delta); Рівненська – 2). Частота штаму Alpha 0.45; 95% ДІ: 0.316-0.596. Частота штаму Delta 0.45; 95% ДІ: 0.316-0.596

Г



75 зразків (Черкаська – 5; Чернівацька – 1; Івано-Франківська – 13; Київська -1; Львівська – 7; Полтавська – 9; Рівненська – 6; Луганська – 27; Тернопольська – 4; Запорізька - 2); Частота штаму Delta 1.00; 95% ДІ: 0.952-1.000

Д



75 зразків (Дніпропетровська – 10; Харківська – 8; Херсонська – 10; Київська – 9; Волинська – 9; Львівська – 9; Одеська – 10; Закарпатська– 10); Частота штаму Delta 1.00; 95% ДІ: 0.952-1.000

Рисунок 27. Розподіл частот різних штамів вірусу SARS-CoV-2 в регіонах України в різні періоди часу за результатами вибіркового повногеномного секвенування зразків.

Геномні послідовності зразків SARS-CoV-2, які мали найкращу якість відповідно міжнародних стандартів (170 додано ІМБГ з 440 зразків з України), після біоінформатичної обробки додано до міжнародної бази даних GISAID, тепер вони доступні науковій спільноті для подальшого аналізу (https://www.gisaid.org).

Зразки, додані в GISAID (133 зразки), були використані для побудови філогенетичного дерева (Рис. 28 та Рис. 29) з використанням

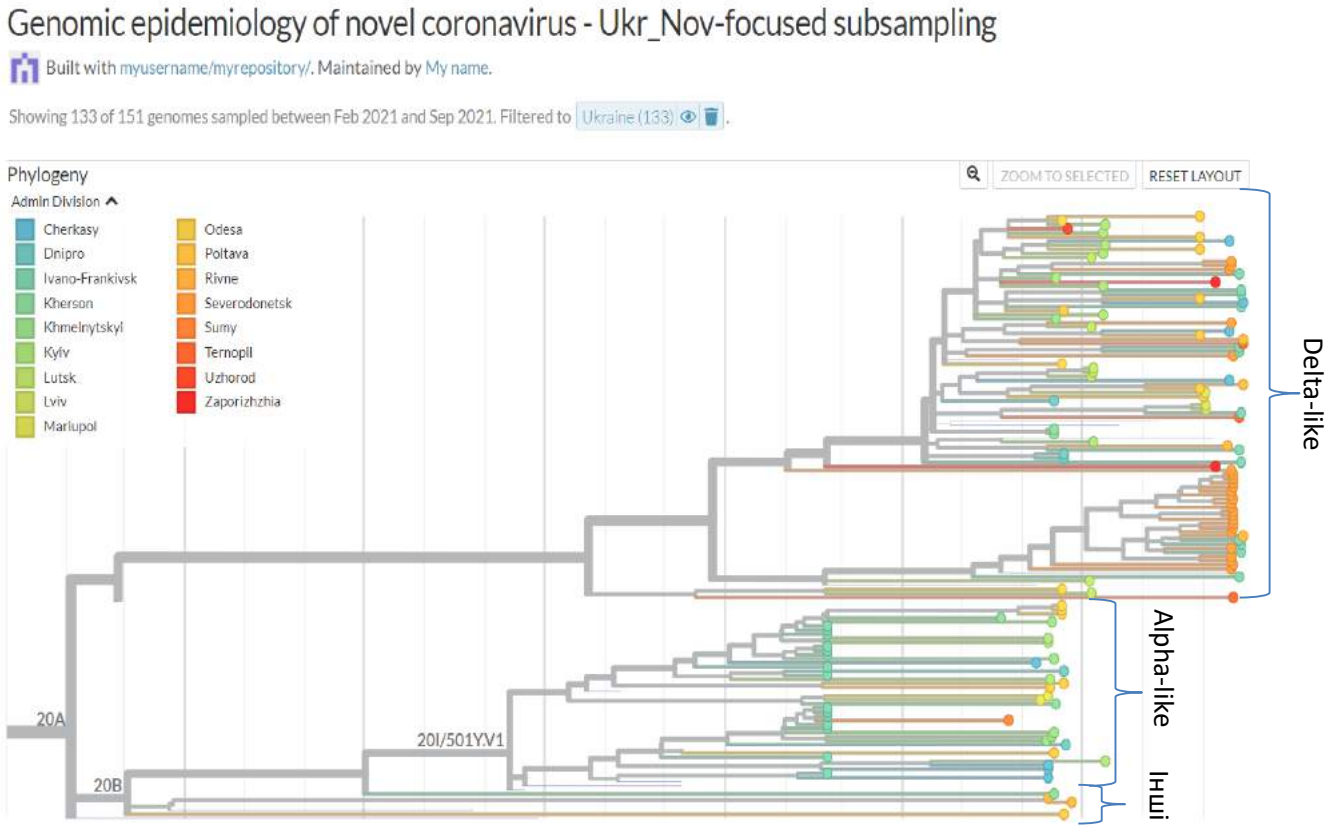


Рисунок 28. Філогенетичне дерево геномів SARS-CoV-2 у хворих з України (шкала за часом).

біоінформатичного ресурсу Nextstrain (https://auspice.us/) з метою дослідження генетичної різноманіття вірусу в певні проміжки часу (кількість різних штамів на певній території в певний період часу), шляхів міграції небезпечних штамів (звідки потрапили до країни, як швидко поширюються в різних регіонах, ефективність карантинних обмежень та їх необхідність в певному регіоні), еволюції та швидкості надбання мутацій цього вірусу (чи є небезпека появи нових штамів з більш агресивними властивостями на території регіону, чи

можуть нові варіанти та штами призвести до погіршення епідеміологічного стану, чи є імовірність розповсюдження штамів з резистентністю до терапії чи вакцинації) у пацієнтів з України.

Найбільша кількість мутацій вірусу SARS-CoV-2 зафіксована у S-протеїні, який є відповідальним за зв'язування вірусу з клітинами людини та проникнення його у клітини, а також за розпізнавання клітинами імунної системи людини.

Завдяки проведеній роботи нами вперше в Україні за допомогою повногеномного генотипування виявлено два нові небезпечні варіанти вірусу SARS-CoV-2 - Альфа варіант (B.1.1.7) – у лютому 2021 року та Дельта варіант (B.1.617.2) – у червні 2021 року. Обидва випадки допомогли своєчасно інформувати український уряд, МОЗ України та суспільство задля своєчасного адекватного реагування та проведення протиепідемічних заходів.

Праймери, які входять у склад запропонованих нами тест-систем, підібрані до N-білка вірусу SARS-CoV-2. Завдяки проведеному генотипуванню та аналізу баз даних мутацій вірусу (Рис. 30) нами практично не знайдено мутацій у регіонах вірусу, до яких підібрано праймери. База даних UCSC

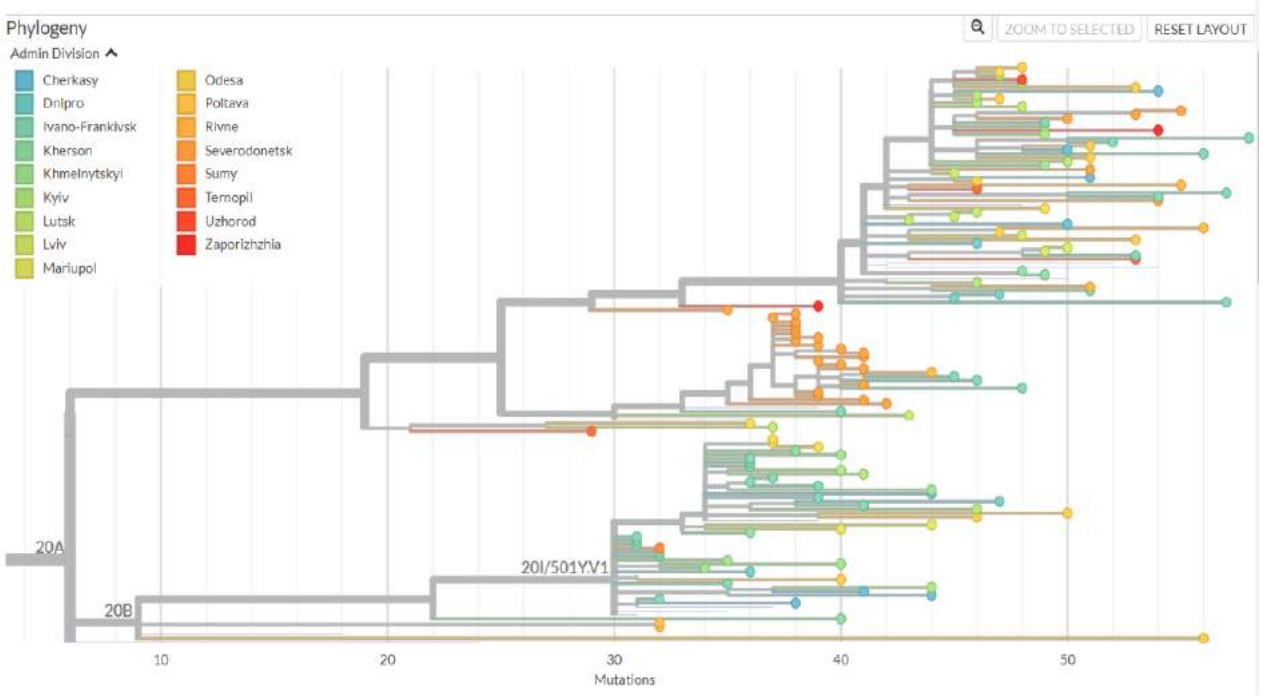


Рисунок 29. Філогенетичне дерево геномів SARS-cov-2 у хворих з України (шкала за кількістю мутацій).

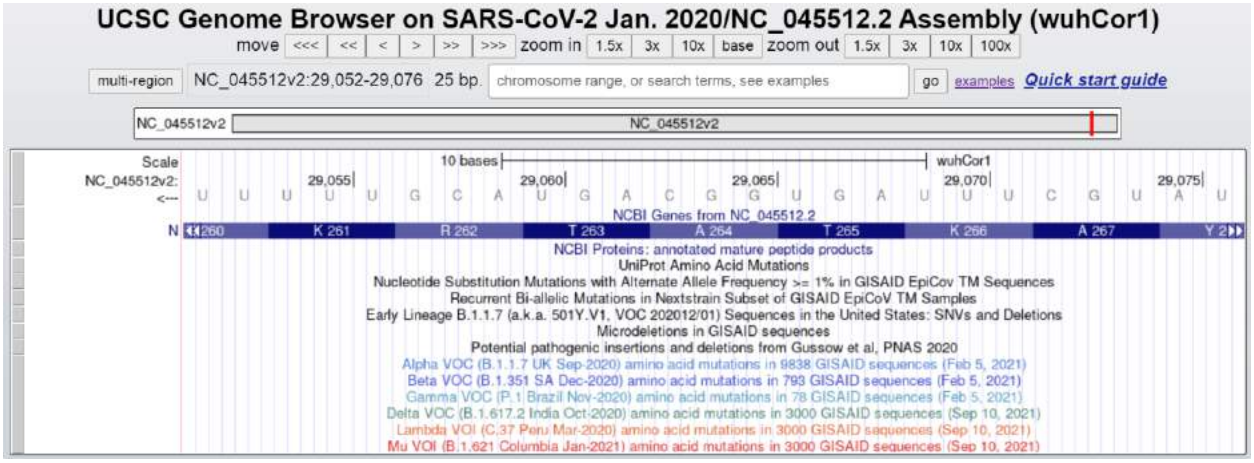


Рисунок 30. Аналіз мутацій фрагменту N-білка вірусу SARS-CoV-2, де знаходяться праймери до запропонованих тест-систем згідно бази даних UCSC Genome Browser.

Genome Browser проаналізувала 3,8 млн. просеквенованих зразків вірусу SARS-CoV-2, з яких було точкових мутацій лише у 215 зразках. Ці результати свідчать про стабільну роботу наших тест-систем. Але цей моніторинг необхідно проводити і надалі у зв’язку з високим ступенем набуття нових мутацій новими варіантами та штамами коронавірусу SARS-CoV-2.

РОЗДІЛ 8. ВСТАНОВЛЕННЯ РІВНІВ ВІДНОСНОЇ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ ІМУННОЇ СИСТЕМИ У ЗДОРОВИХ ДОНОРІВ ТА ХВОРИХ НА ОСОБЛИВО НЕБЕЗПЕЧНІ ВІРУСНІ ЗАХВОРЮВАННЯ ДЛЯ РОЗРОБКИ КОМБІНОВАНОЇ ТЕСТ-СИСТЕМИ

8.1. Встановлення рівнів відносної експресії генів імунної системи у здорових донорів

Імунітет є засобом захисту організму від шкідливої для нього генетично чужої інформації екзогенного (мікроорганізми, віруси, токсини) та ендогенного (змінені, пухлинні клітини) походження. Він спрямований на підтримку генетичного гомеостазу, структурної і функціональної цілісності та антигенної індивідуальності організму. Виділяють неспецифічні (вроджений імунітет) та специфічні (адаптивний імунітет) захисні реакції хазяїна (Рис. 31) [19].

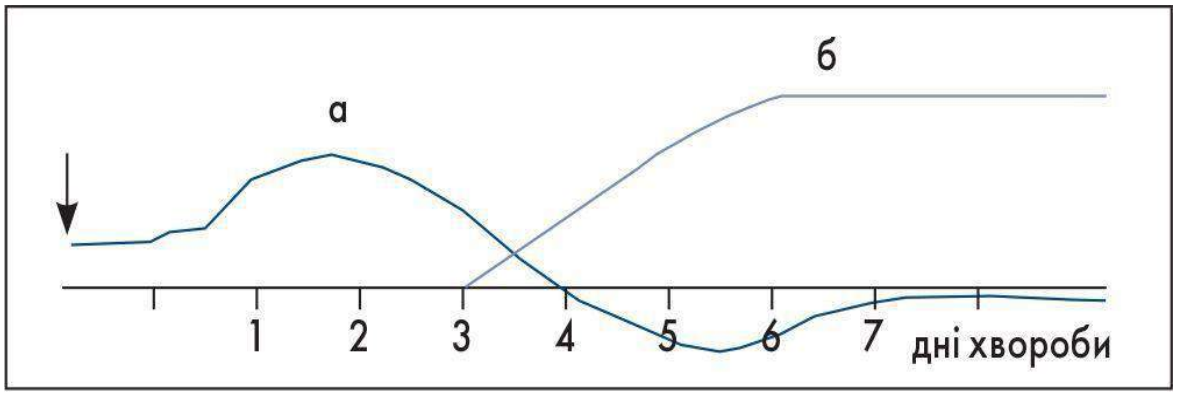


Рисунок 31. Схема захисних імунних реакцій за умов інфекції грипу у людини: а – неспецифічні; б – специфічні [19].

Уроджений (неспецифічний, спадковий) імунітет людини – це генетично обумовлена здатність організму протидіяти «чужим» за поверхневими антигенами агентів (мікроорганізми, трансплантати, токсини, онкологічні клітини, віруси), яка існує ще до першої появи їх в організмі [20, 21]. Здоровий

уроджений імунний захист організму контролює своєчасне виявлення та знищення цих факторів, зокрема власних мутантних клітин з онкологічними властивостями [22]. За вроджений імунітет відповідає низка генів, зміна активності яких запускає або гальмує каскад реакцій імунного захисту. У кожного індивіда експресія цих генів має особливості, що визначає індивідуальні особливості вродженої імунної відповіді та здатності ефективно протидіяти екзогенним факторам та раку. Певні особливості вродженого імунітету, які можуть бути ідентифіковані на рівні змін експресії генів, є маркерами патологічного процесу (онкологічного або/та інфекційного захворювання) [23, 24]. З іншого боку генетично обумовлене ослаблення УІ збільшує ризик появи таких захворювань в майбутньому.

Враховуючи стрімке поширення загрозливих для життя та здоров'я людини захворювань, зокрема онкопатологій, хронічних та гострих інфекційних захворювань, та зниження ефективності їх терапії [23], встановлення індивідуальних особливостей стану уродженого імунітету пацієнту, зокрема в процесі лікування, є нагальною потребою прогнозування та персоніфікованої медицини.

Результати наших попередніх досліджень свідчать про те, що гени вродженого імунітету, які задіяні у противірусному захисті, також беруть участь у системі протипухлинного захисту [25, 26]. Таким чином, аналіз експресії генів, що відносяться до різних ланок імунітету є важливим для діагностики, прогнозу і протоколу лікування важких захворювань.

Було показано, що клітини периферичної крові є цінними для оцінки змін експресії генів, які асоційовані з захворюваннями [27-31] та ефективністю їх лікування [32]. До того ж, зразки крові є легкодоступними, малоінвазивними і можуть бути зібрані за низьку вартість, що робить їх привабливою альтернативною формою для діагностичних цілей. Тому актуальним було дослідити рівні відносної експресії генів імунної системи у здорових донорів.

У даній роботі ми встановили рівні відносної експресії генів імунної системи у 59 здорових донорів, зокрема *MX1*, *OAS1*, *RNASEL*, *EIE2AK2*, *IL8*, *IL6*, *TNFα*, *IL10*, *CD4*, *F5* (Рис. 32-41). Отримані результати рівнів відносної експресії генів імунної системи у здорових волонтерів є важливим підґрунтям для розробки діагностичних тестів та протоколів аналізу.

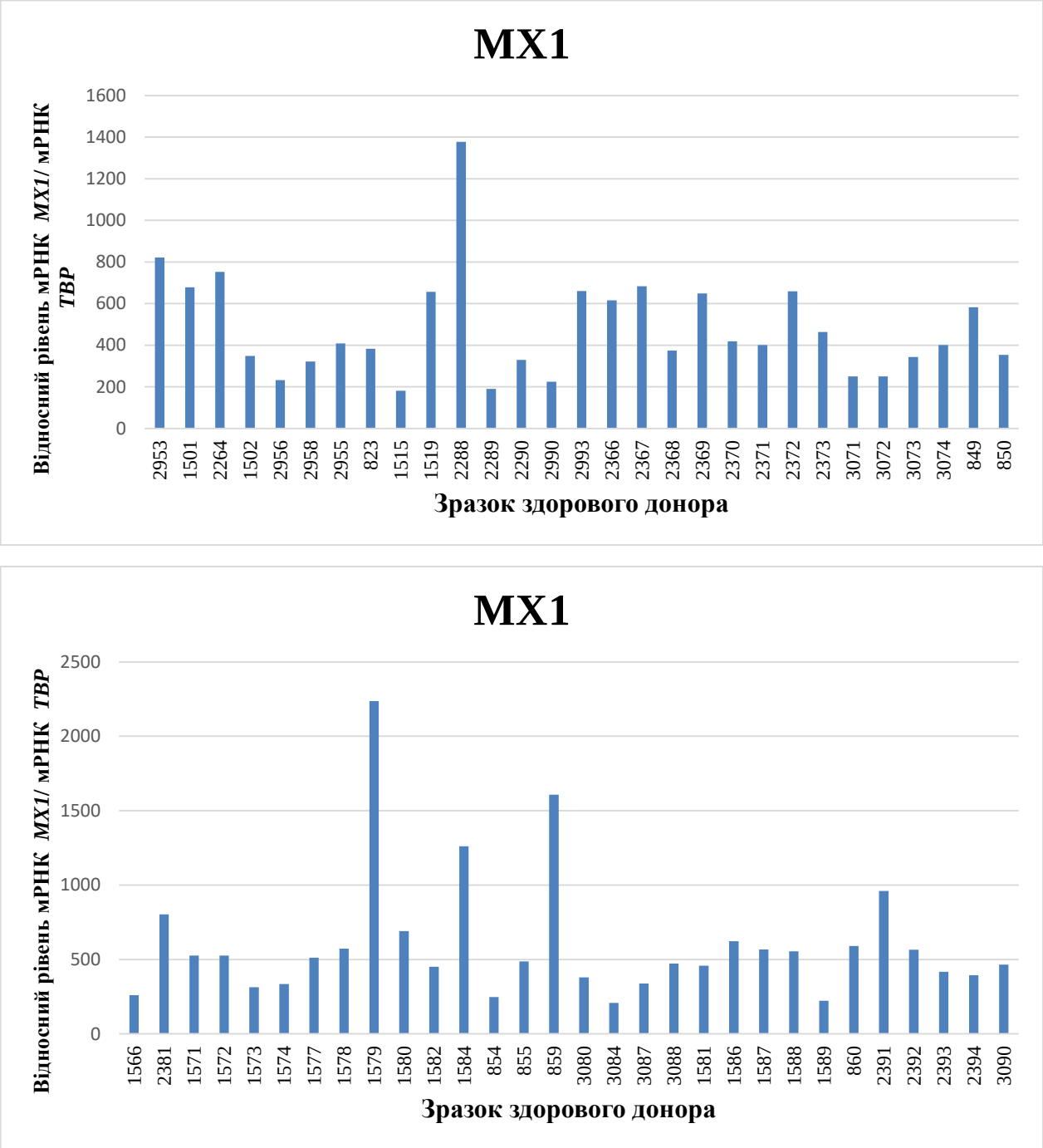
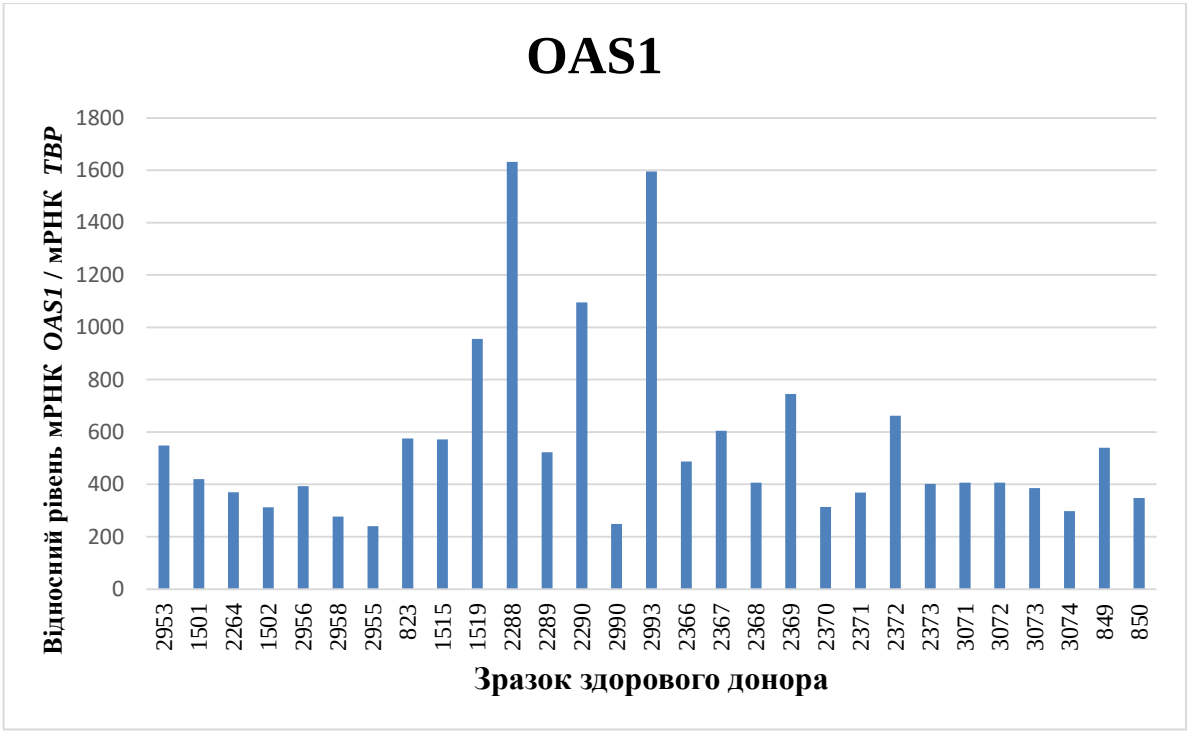


Рисунок 32. Рівні відносної експресії гену *MX1* (MX dynamin like GTPase 1 (гуанозинтрифосфат зв'язуючий білок Mx1)) у клітинах периферичної крові здорових волонтерів



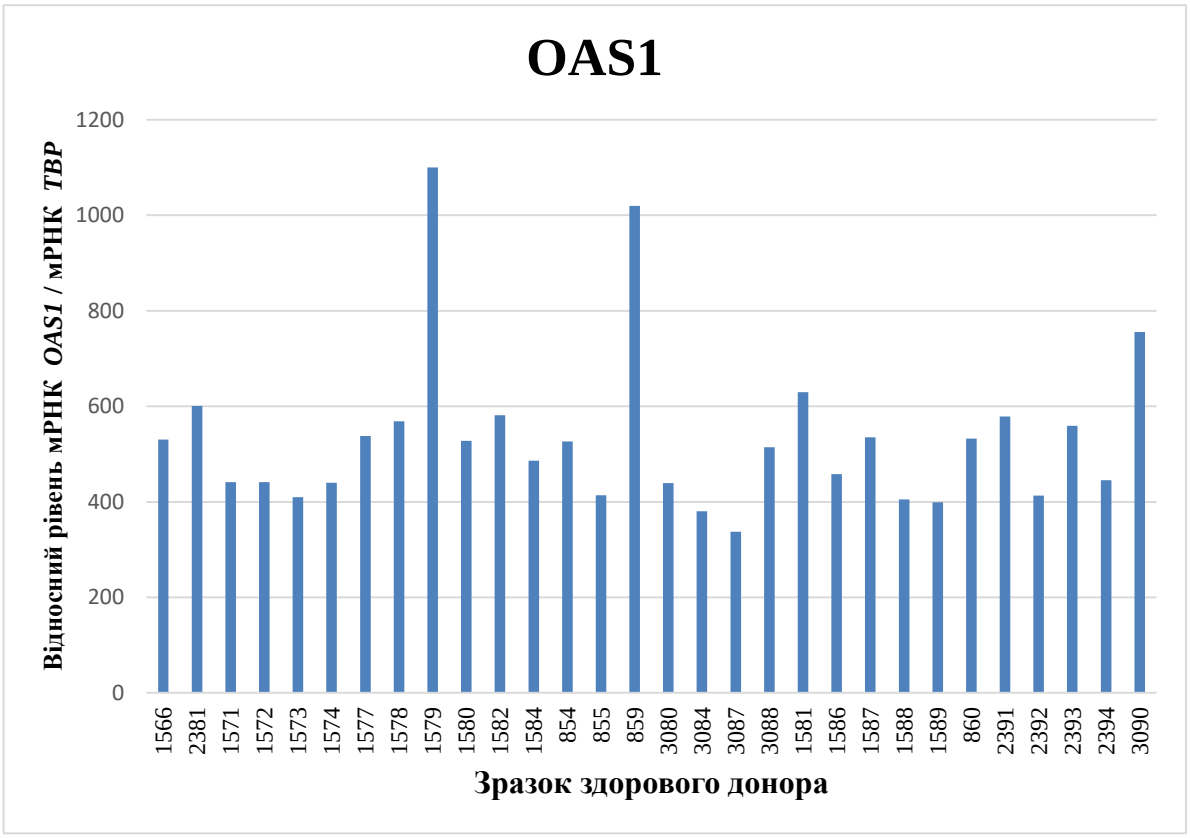
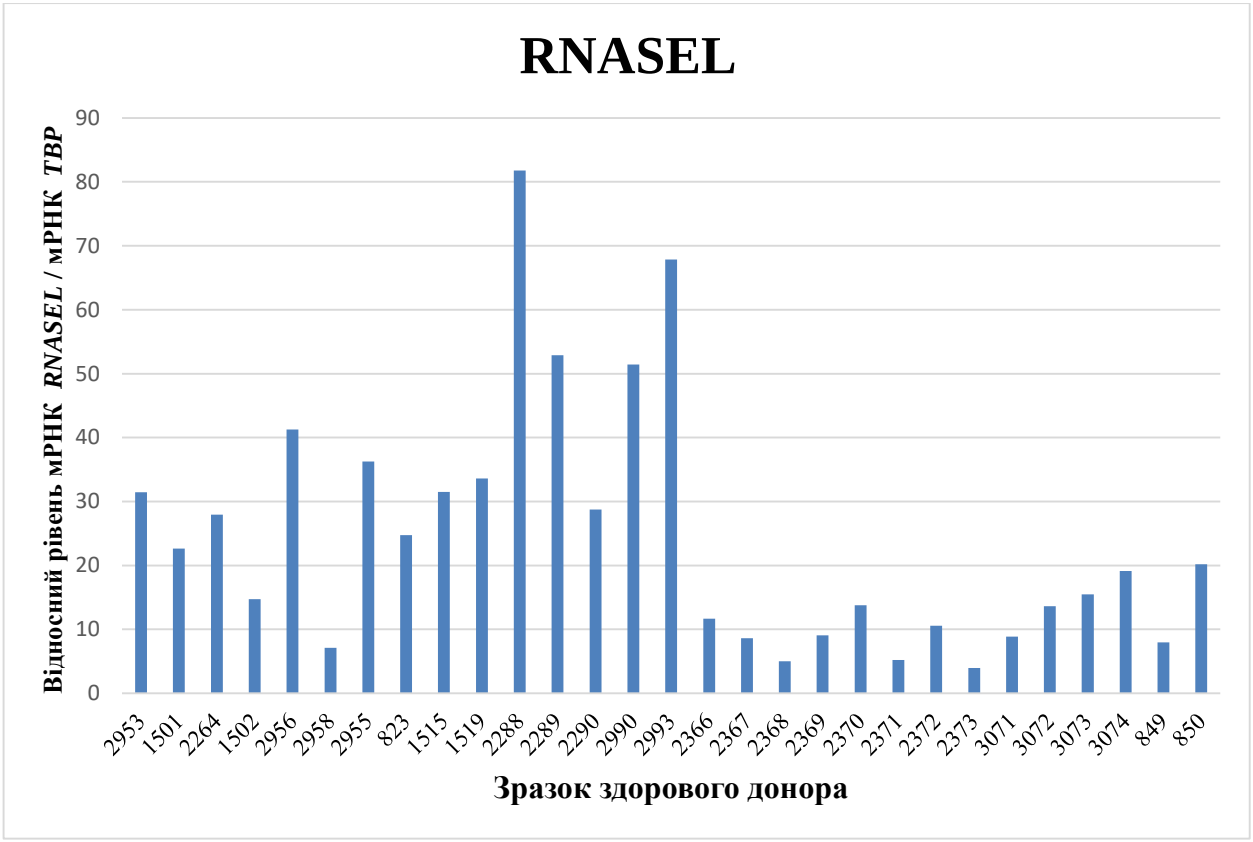


Рисунок 33. Рівні відносної експресії гену *OAS1* (2′-5′ oligoadenylate synthetase 1A (2′-5′ олігоаденілатсинтетаза 1А)) у клітинах периферичної крові здорових волонтерів



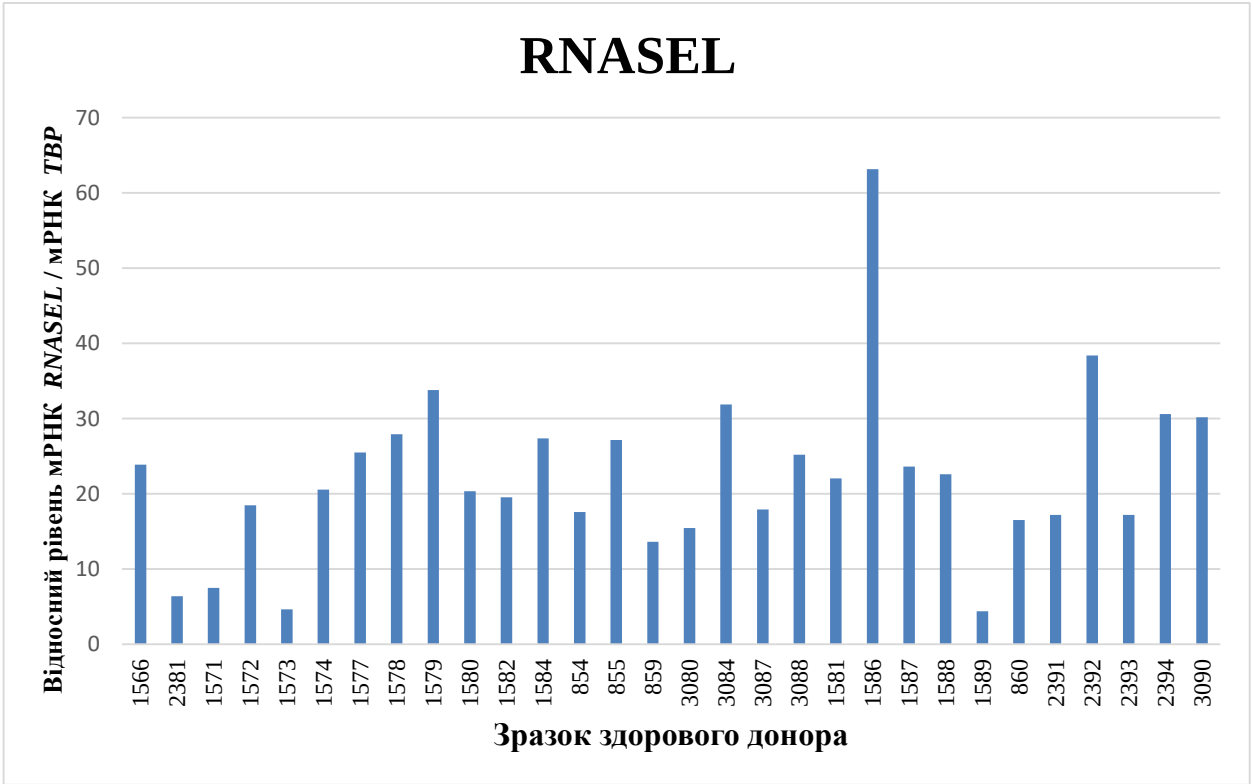
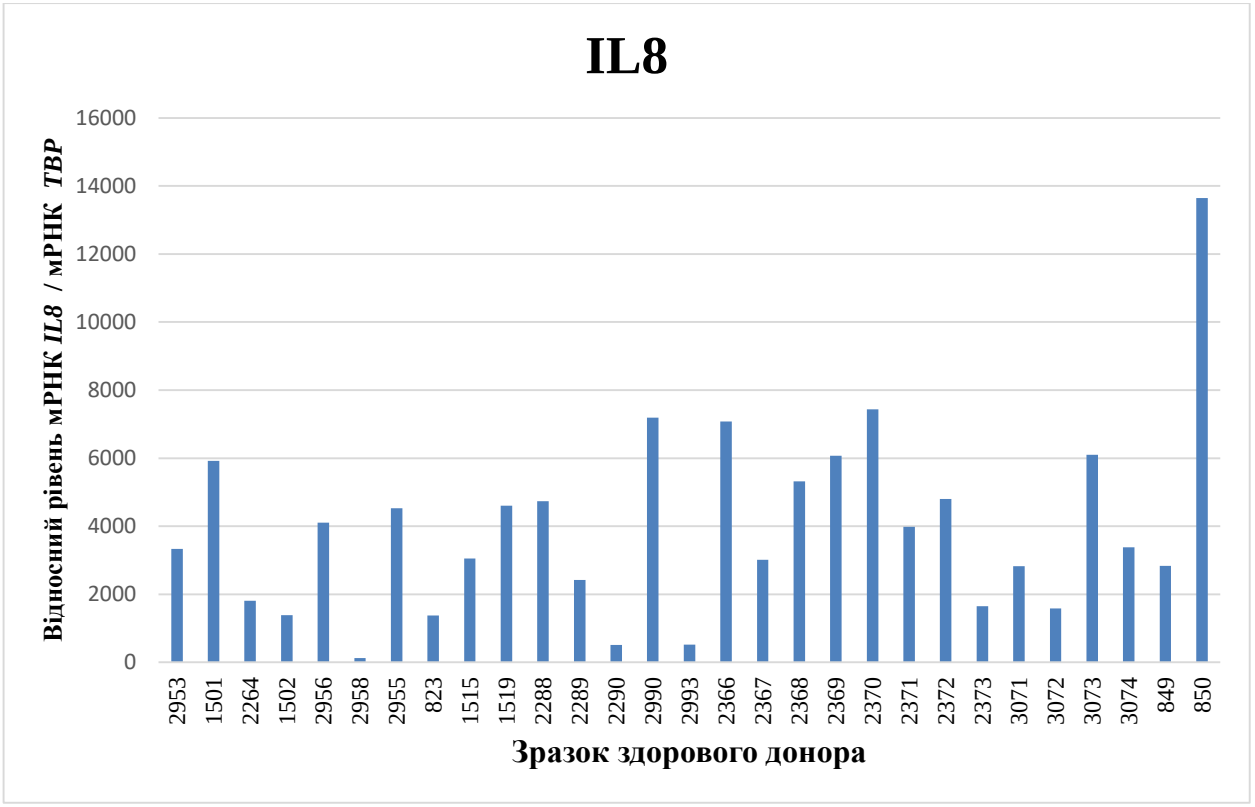


Рисунок 34. Рівні відносної експресії гену *RNASEL* (2′,5′-oligoisoadenylate synthetase-dependent ribonuclease L (рибонуклеаза L, 2′,5′-олігоаденілат залежна ендонуклеаза)) у клітинах периферичної крові здорових волонтерів

Рисунок 35. Рівні відносної експресії гену *EIE2AK2* (eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 2 (кіназа 2 еукаріотичного фактору ініціації трансляції 2-альфа)) у клітинах периферичної крові здорових волонтерів



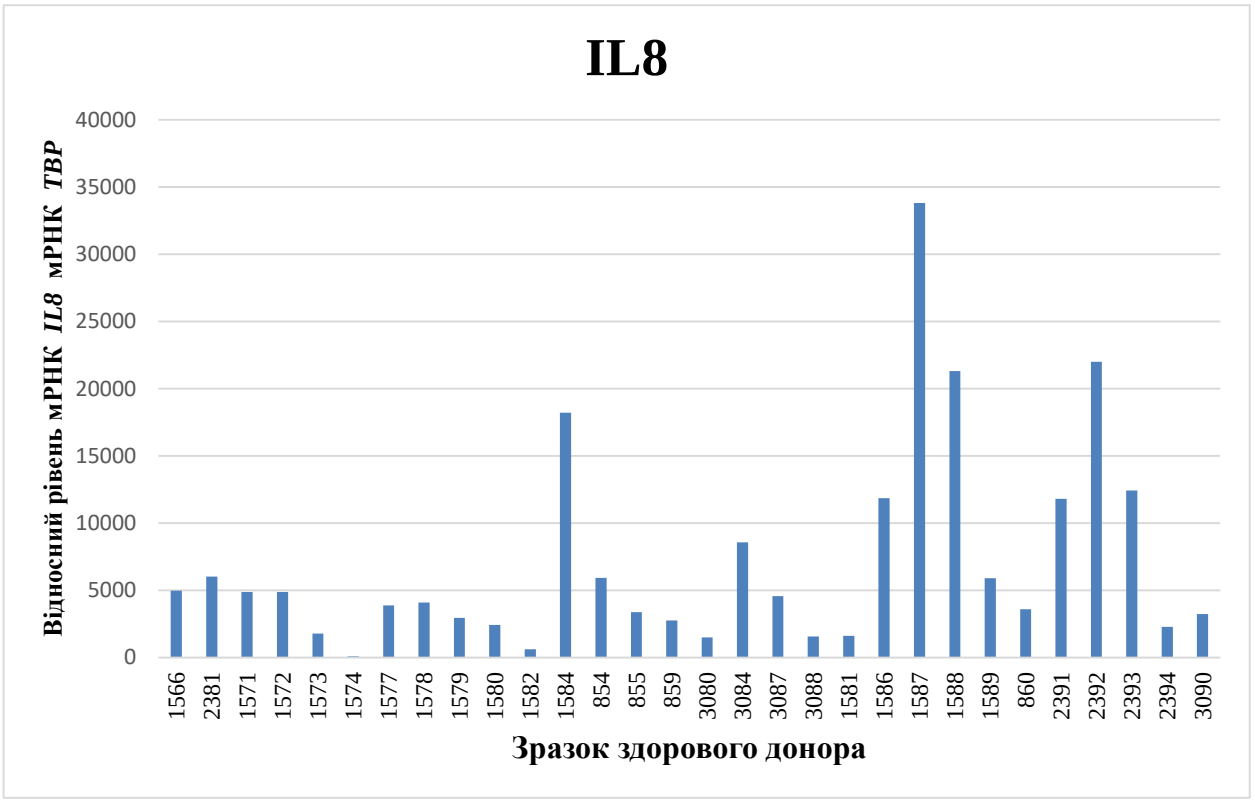
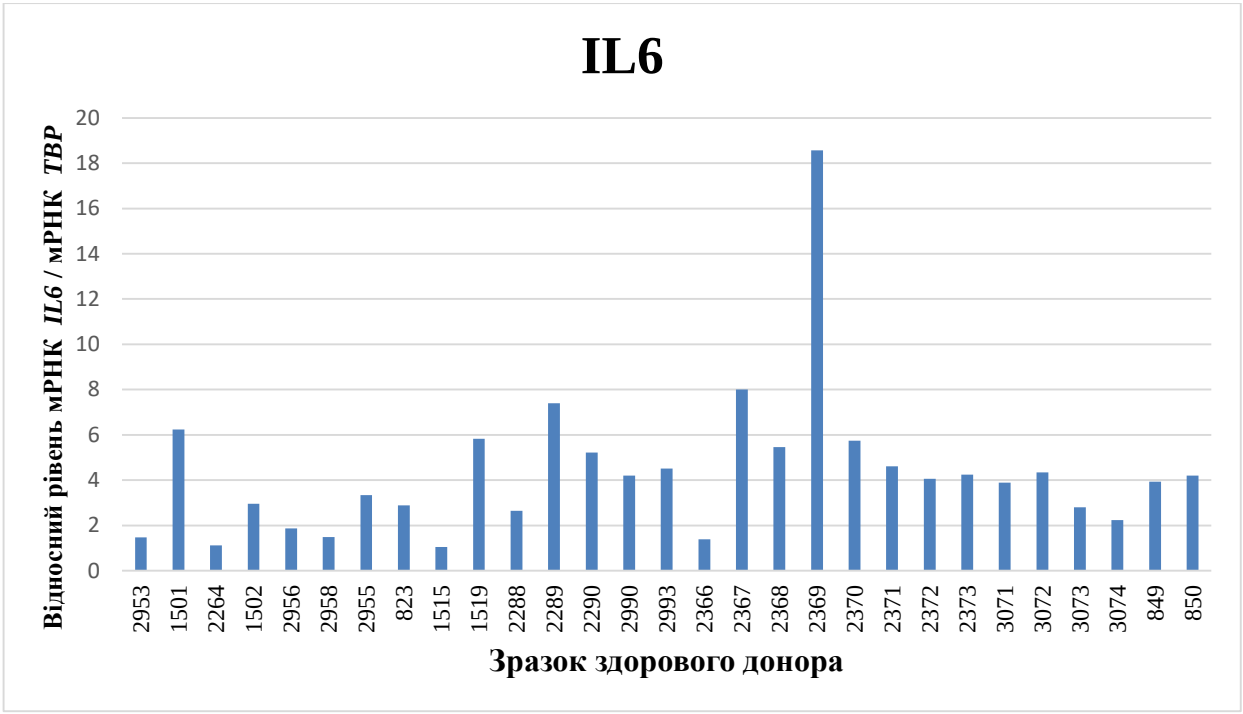


Рисунок 36. Рівні відносної експресії гену *IL8* (interleukin 8 (інтерлейкін 8)) у клітинах периферичної крові здорових волонтерів



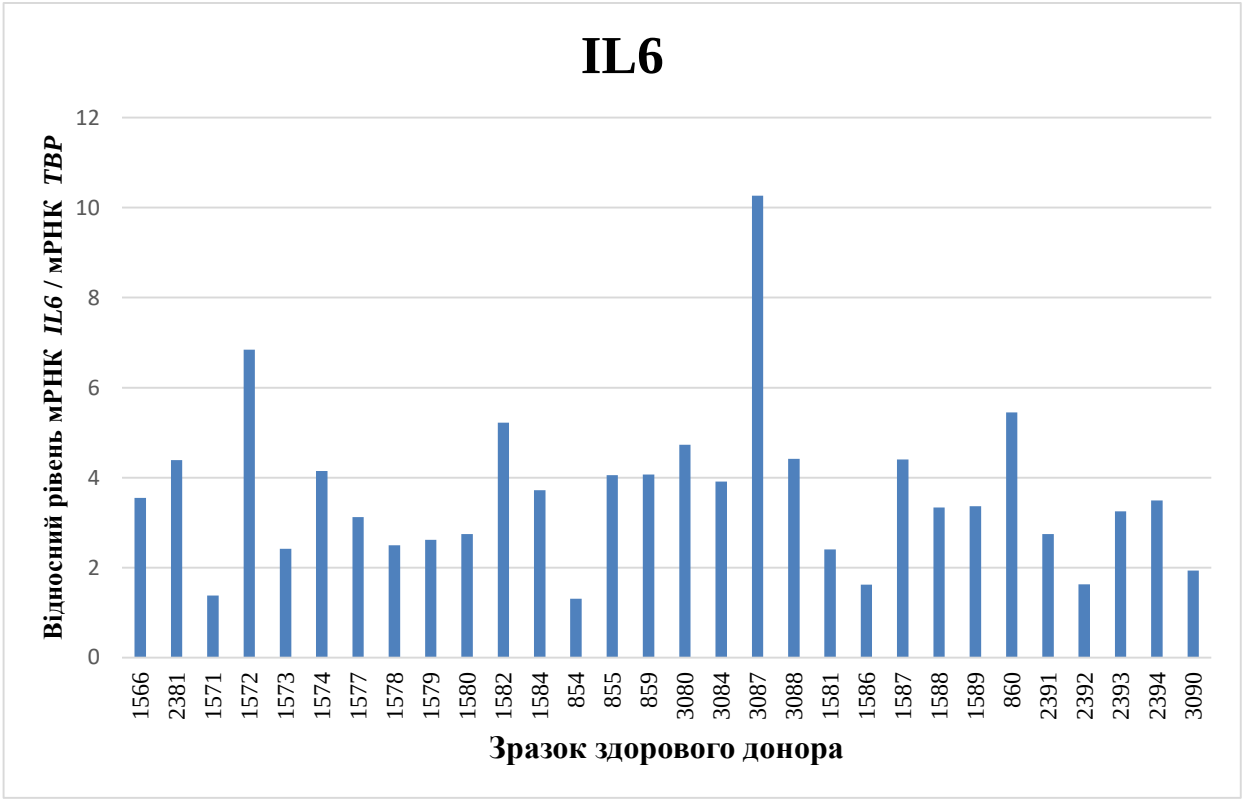
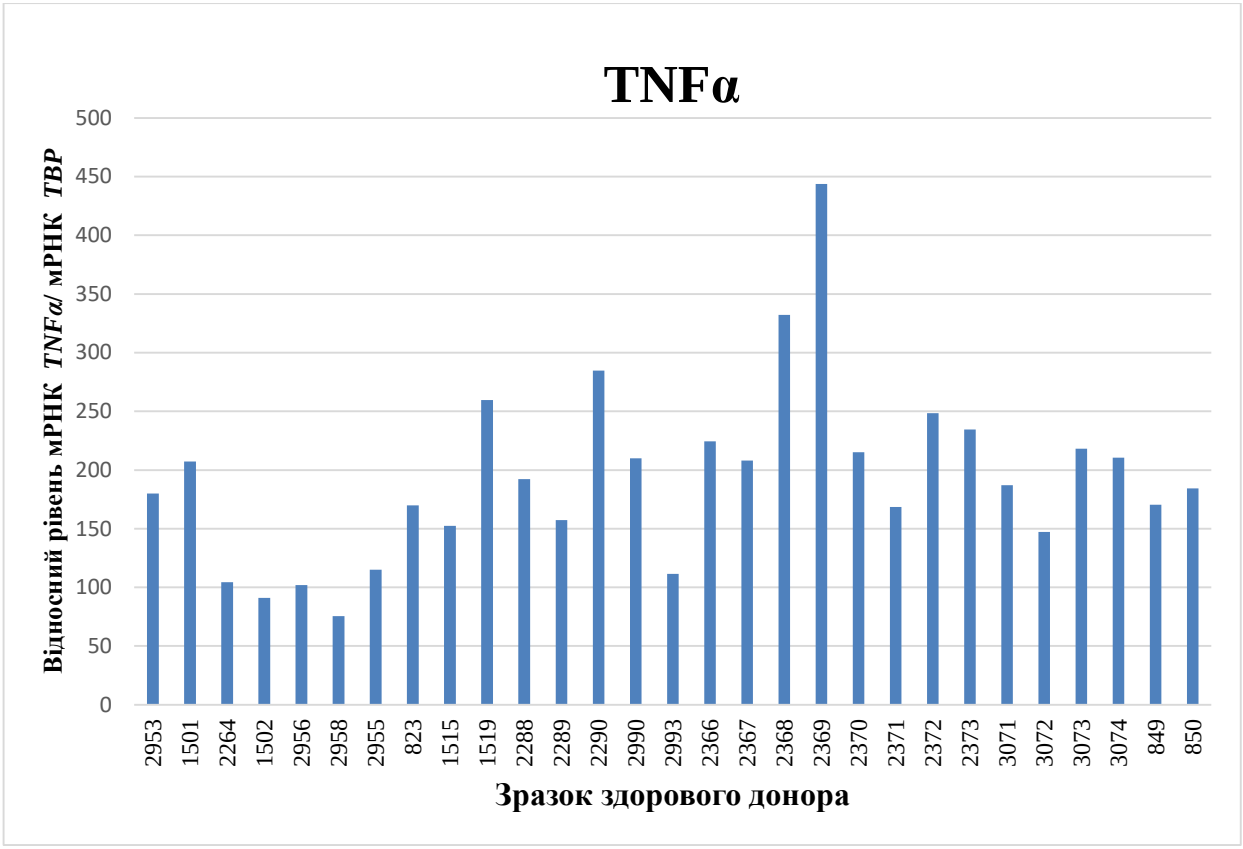


Рисунок 37. Рівні відносної експресії гену *IL6* (interleukin 6 (інтерлейкін 6)) у клітинах периферичної крові здорових волонтерів


TNFα
Відносний рівень мРНК TNFα/ мРНК TBP
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
2953
1501
2264
1502
2956
2958
2955
823
1515
1519
2288
2289
2290
2990
2993
2366
2367
2368
2369
2370
2371
2372
2373
3071
3072
3073
3074
849
850
Зразок здорового донора

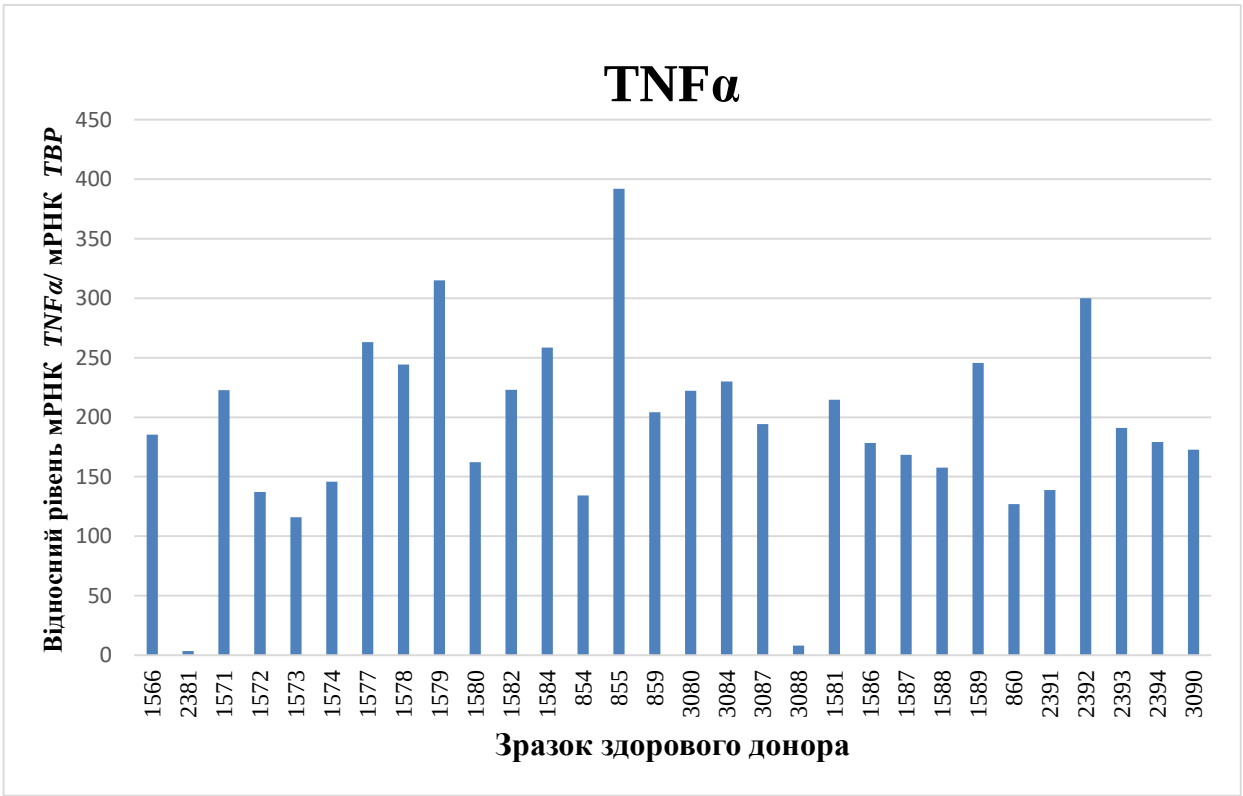
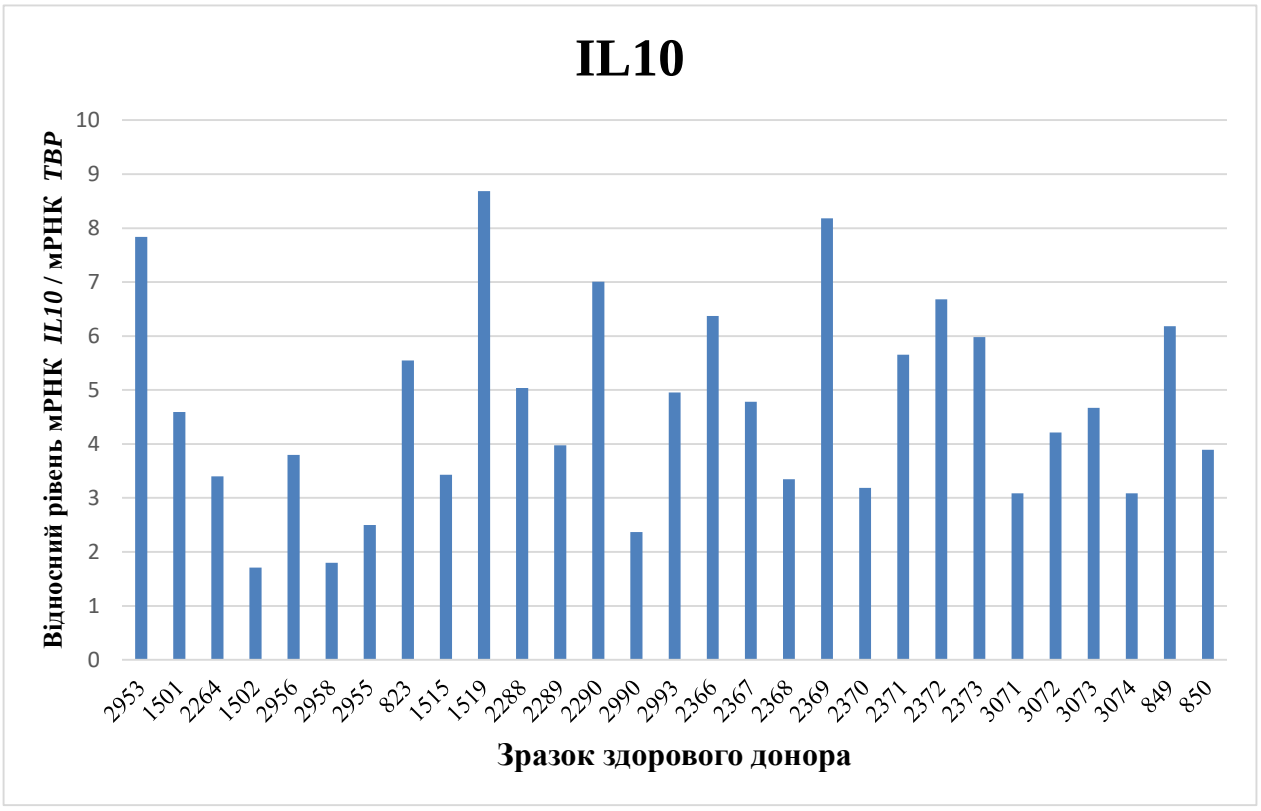

TNFα
Відносний рівень мРНК TNFα/ мРНК TBP
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
1566
2381
1571
1572
1573
1574
1577
1578
1579
1580
1582
1584
854
855
859
3080
3084
3087
3088
1581
1586
1587
1588
1589
860
2391
2392
2393
2394
3090
Зразок здорового донора

Рисунок 38. Рівні відносної експресії гену *TNFα* (tumor necrosis factor alpha (фактор некрозу пухлин альфа)) у клітинах периферичної крові здорових волонтерів



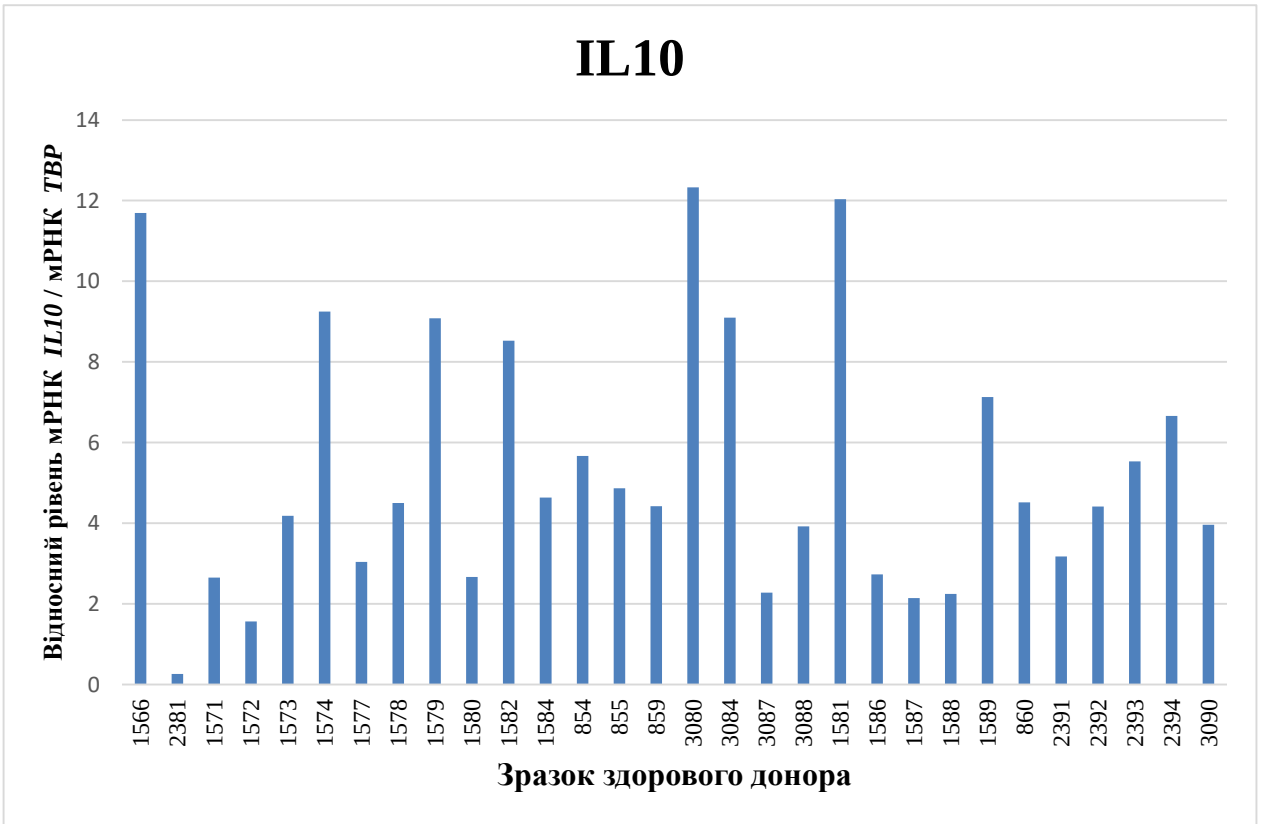
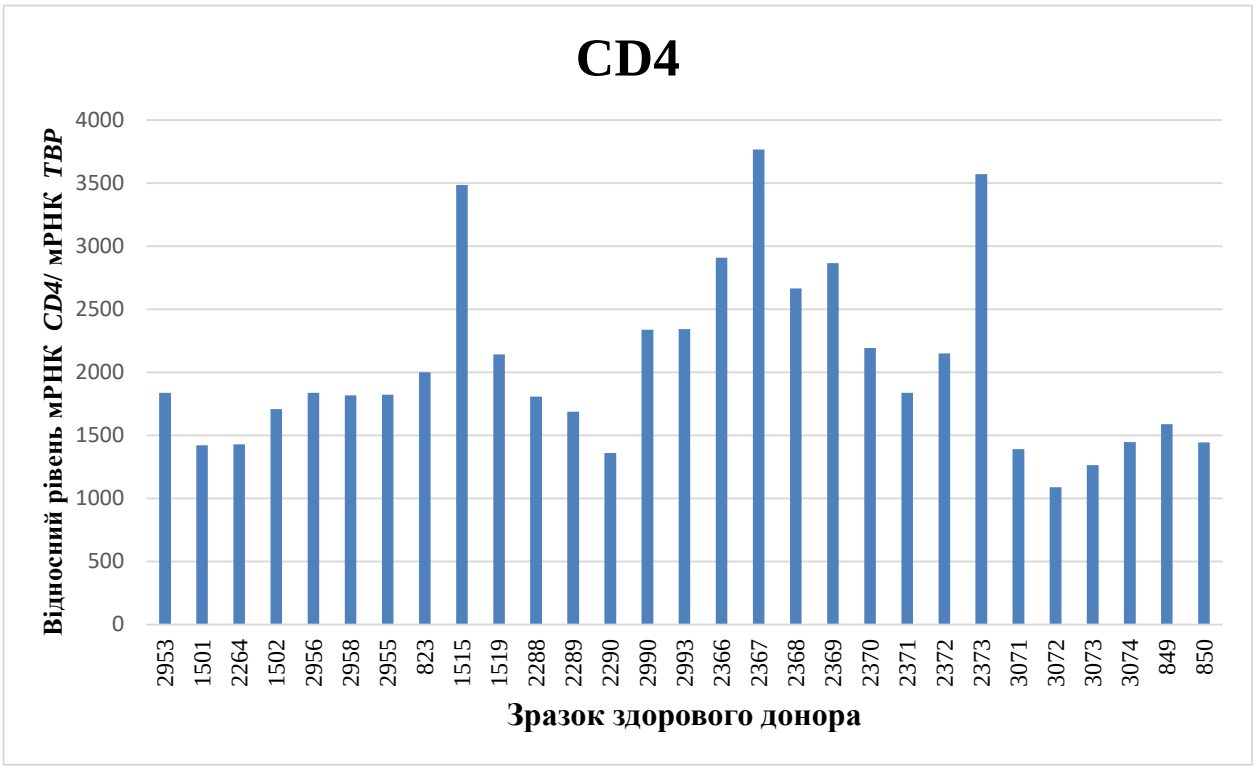


Рисунок 39. Рівні відносної експресії гену *IL10* (interleukin 10 (інтерлейкін 10)) у клітинах периферичної крові здорових волонтерів



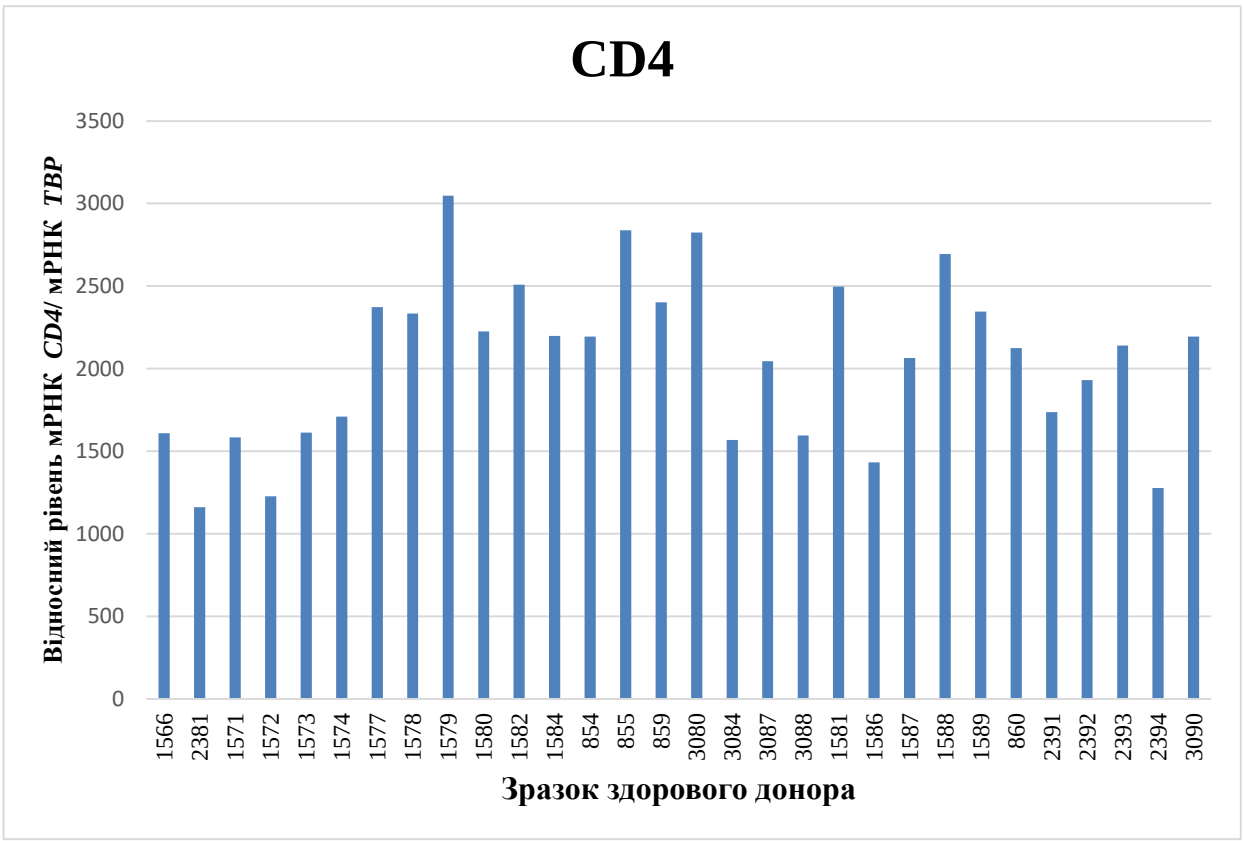
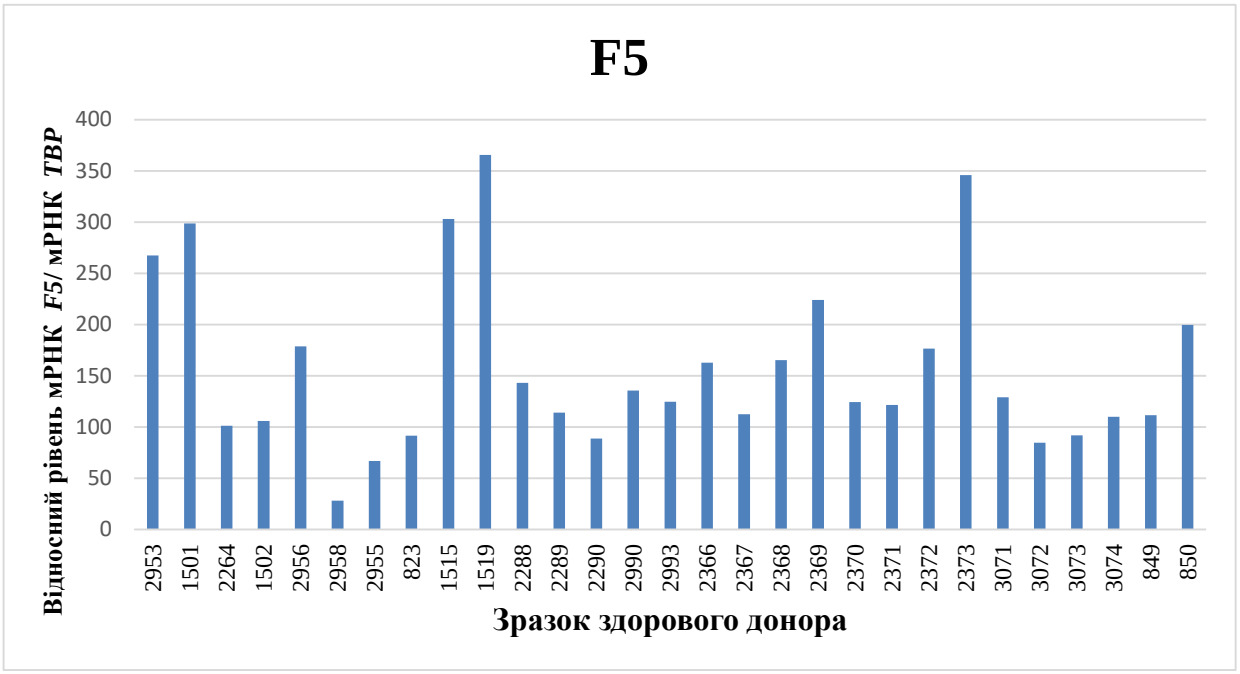


Рисунок 40. Рівні відносної експресії гену *CD4* (T-Cell Surface Glycoprotein CD4 (глікопротеїн CD4 на мембранні Т-лімфоцитів)) у клітинах периферичної крові здорових волонтерів



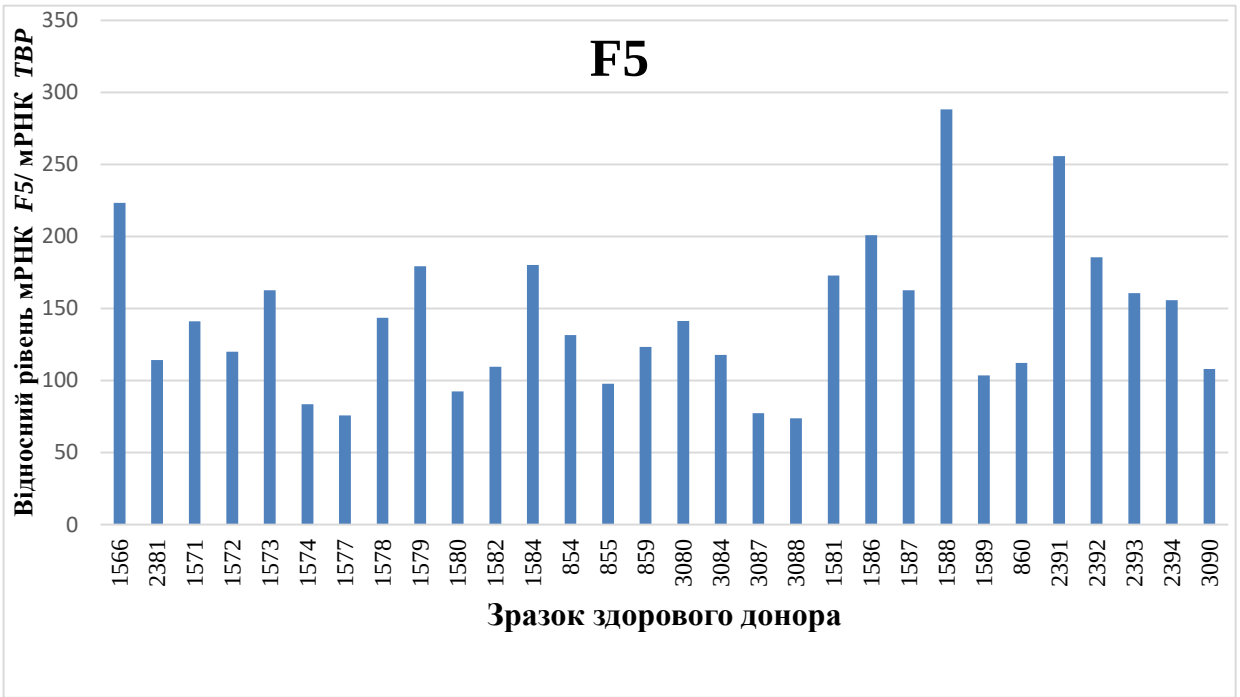


Рисунок 41. Рівні відносної експресії гену *F5* (coagulation factor V (фактор коагуляції 5)) у клітинах периферичної крові здорових волонтерів

Отже, встановлення рівнів відносної експресії досліджуваних генів у здорових донорів показало досить високі рівні дисперсії для деяких генів, що при наступному статистичному аналізі може потребувати більш презентативної вибірки зразків для цих генів.

8.2. Встановлення рівнів відносної експресії генів імунної системи у хворих на особливо небезпечні вірусні захворювання

Вроджений імунітет є першою стадією захисту організму від вторгнення патогенів і пов'язаний з високо консервативним механізмом клітинної сигналізації хазяїна. Система вродженого імунітету виконує низку наступних функцій: рекрутинг імунних клітин до місця інфекції через надвиробництво медіаторів запалення, цитокінів [33, 34]; ідентифікація та видалення чужорідних субстанцій, присутніх в органах, тканинах, крові та лімфі, за допомогою спеціалізованих лейкоцитів; активація адаптивної імунної системи [35].

Вроджена імунна система розпізнає вірусну інфекцію за допомогою лімітованої кількості детерміновано закодованих патерн-розпізнавальних рецепторів (RIG-1, TLR 3, 7, 8 та 9), які активують про-запальний фактор транскрипції NF-κB [36]. Активований NF-κB викликає секрецію INF I типу, про-запальних цитокінів (*IL6, IL8, TNFα)*, ейкозаноїдів та хемокінів. Надпродукція INF I типу зумовлює противірусний стан шляхом стимулювання експресії тисячі генів, які відомі як інтерферон-стимульовані гени, зокрема *MX1, OAS1, RNASEL, EIE2AK2* [37, 38]. Про-запальні цитокіни викликають рекрутинг циркулюючих попередників моноцитів та їхню диференціацію на альвеолярні макрофаги моноцитарного походження та дендритні клітини. Індуковані вірусом дендритні клітини мігрують до регіональних лімфатичних вузлів активуючи цитотоксичні (CD8+) та хелперні (CD4+) Т-клітини, а також рідкісні Т-клітини пам'яті, які здатні викликати адаптивну імунну відповідь [39, 40]. Паралельно вірусні антигени та ендоцитовані віруси індукують вивільнення IFN типу I та запальні цитокіни з тканино-резидентних альвеолярних макрофагів та дендритних клітин [41]. Високий рівень про-запальних цитокінів («цитокіновий шторм»)

призводить до місцевого та системного запалення індукуючи оксидативно-опосередковані пошкодження, лихоманку та анорексію.

Клінічний перебіг коронавірусної хвороби 2019 (COVID-19) варіюється від легких симптомів до синдрому гострого респіраторного дистресу, гіперзапалення та порушення згортання крові. Оскільки кровотворна система відіграє критичну роль у спостережуваному гіперзапаленні, особливо у важкохворих [40], тому раннє виявлення маркерів запалення та коагуляції може вказувати на початок «цитокінового шторму», порушення згортання крові та допомагати лікарям своєчасно вживати заходів. Тож наступним етапом дослідження було визначення рівнів відносної експресії генів імунної системи у хворих з гострою формою COVID-19.

У цьому досліджені ми встановили рівні відносної експресії генів імунної системи (*MX1, OAS1, RNASEL, EIE2AK2, IL8, IL6, TNFα, IL10, CD4, F5*) у крові 52 пацієнтів з гострою формою COVID-19 (Рис. 42-51).

Отримані результати встановлення рівнів відносної експресії генів імунної системи у пацієнтів з гострою формою COVID-19 є важливою передумовою розробки молекулярно-генетичних діагностичних комбінованих панелей для раннього виявлення гіперзапалення та порущення параметрів згортання крові у пацієнтів з гострою формою COVID-19 та оцінки ефективності лікування цього захворювання. Однак отримані результати потребують на наступному етапі дослідження детального статистичного аналізу.

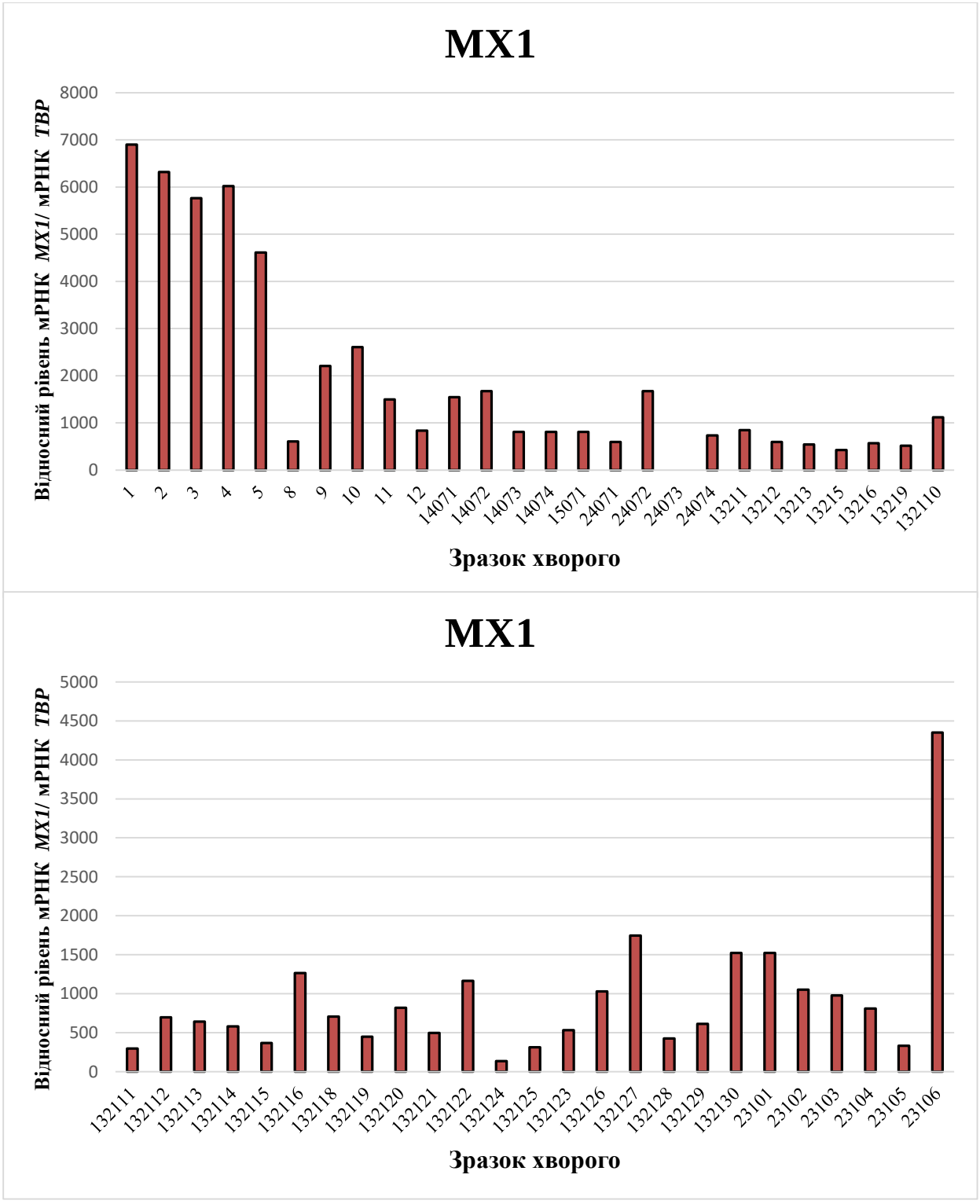
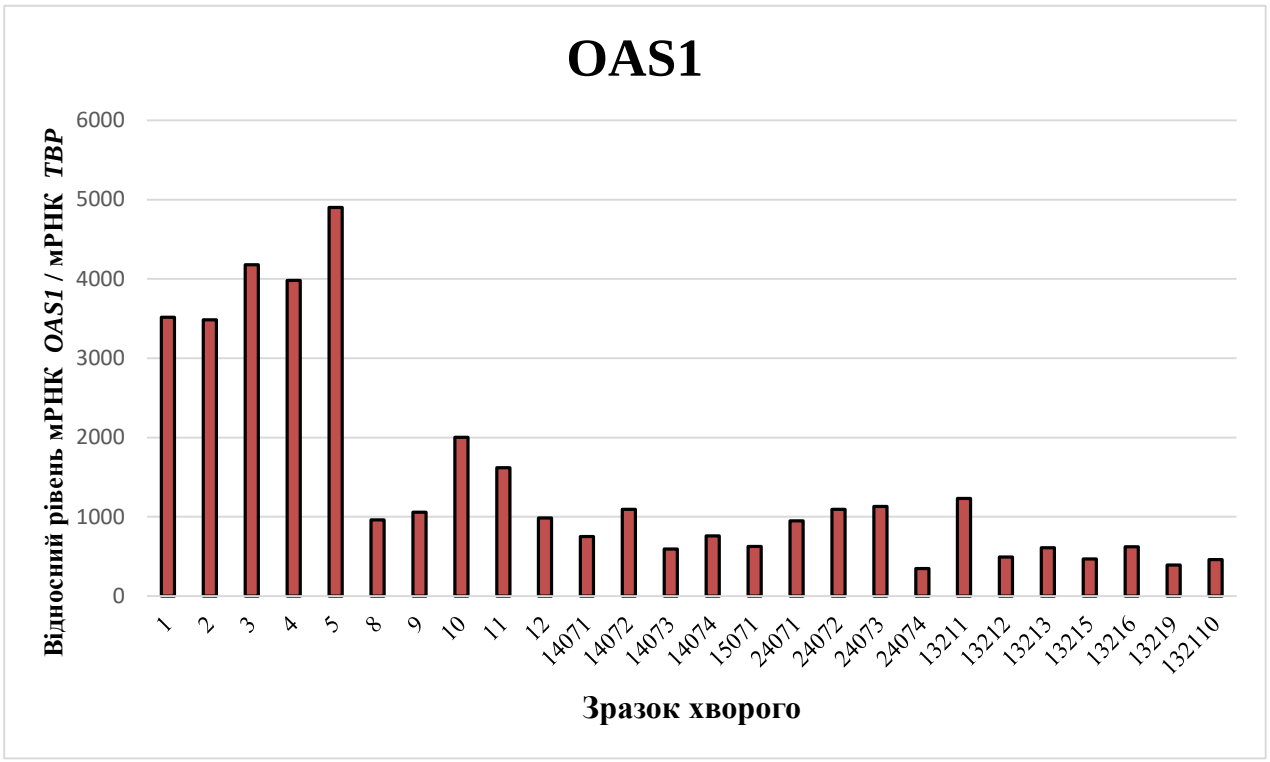


Рисунок 42. Рівні відносної експресії гену *MX1* (MX dynamin like GTPase 1 (гуанозинтрифосфат зв'язуючий білок Mx1)) у клітинах периферичної крові пацієнтів з гострою формою COVID-19


OAS1
Відносний рівень мРНК OAS1 / мРНК TBP
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
1
2
3
4
5
8
9
10
11
12
14071
14072
14073
14074
15071
24071
24072
24073
24074
13211
13212
13213
13215
13216
13219
132110
Зразок хворого

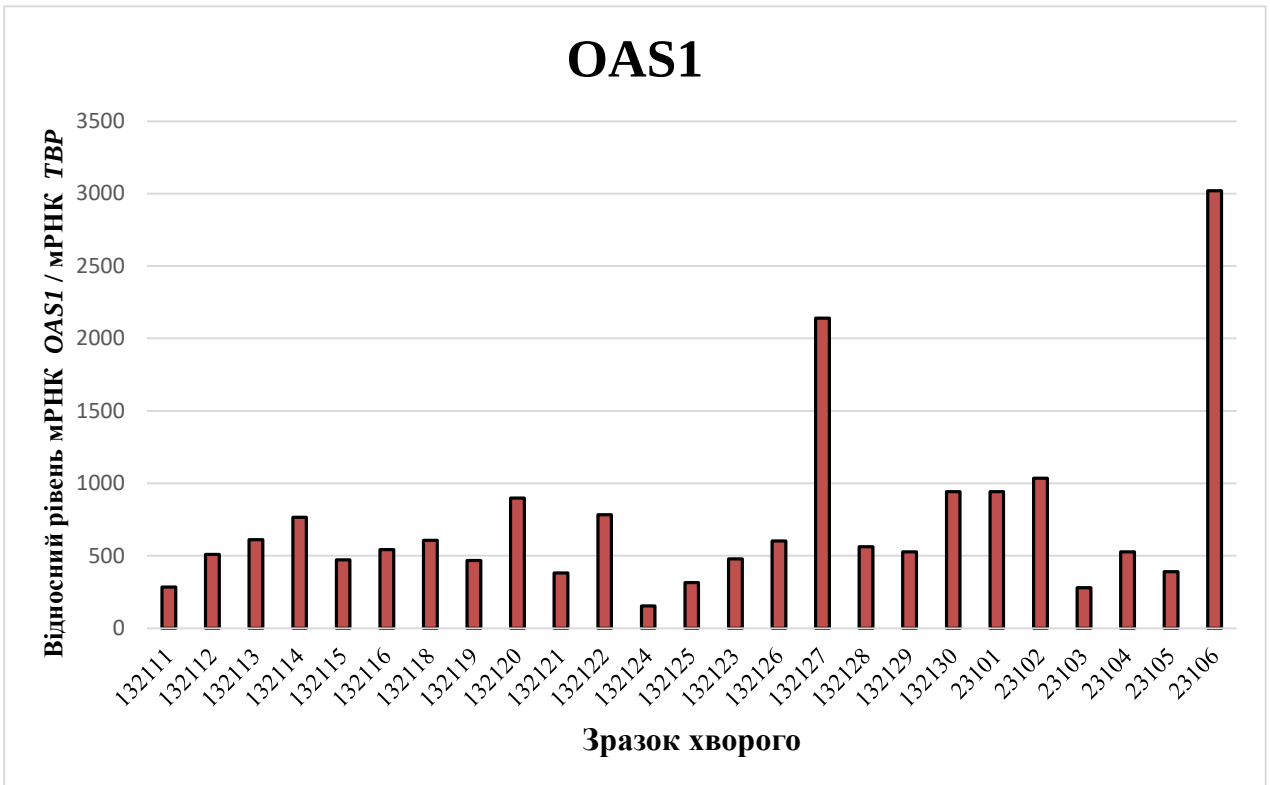
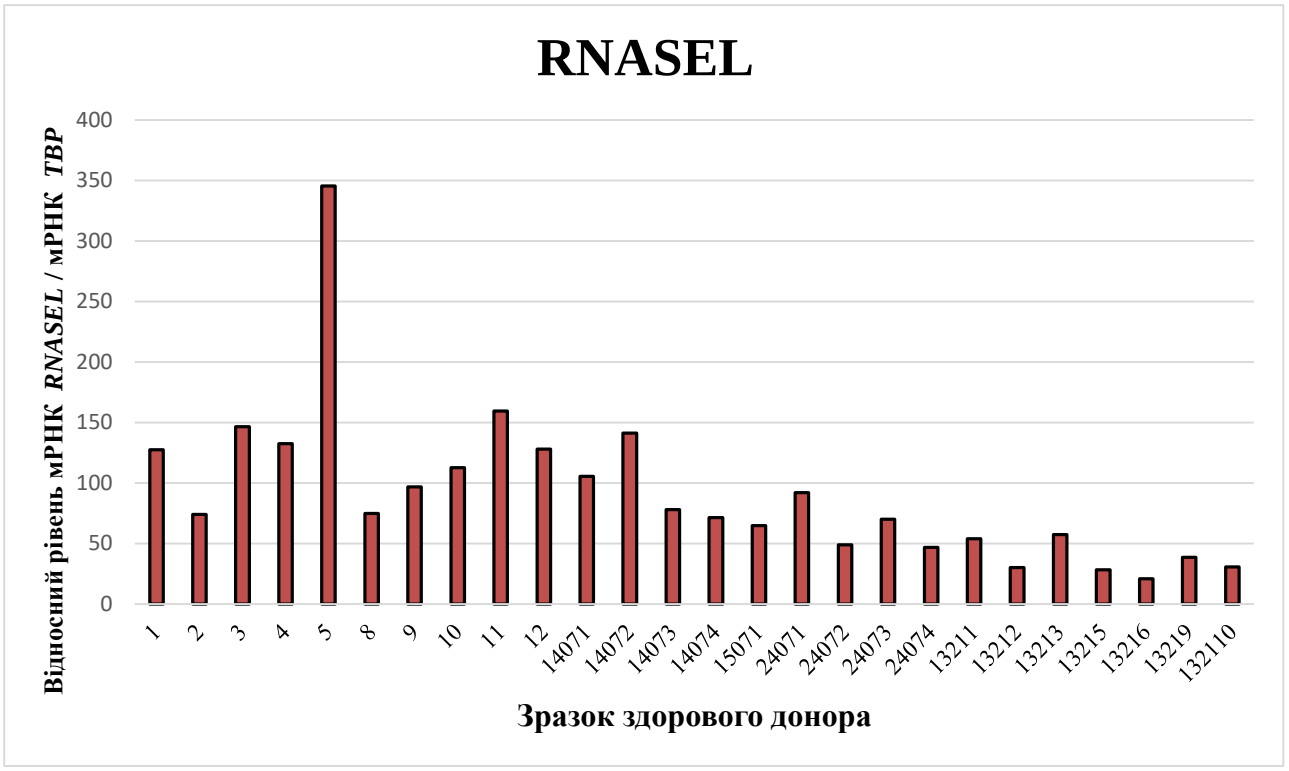

OAS1
Відносний рівень мРНК OAS1 / мРНК TBP
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
132111
132112
132113
132114
132115
132116
132118
132119
132120
132121
132122
132124
132125
132123
132126
132127
132128
132129
132130
23101
23102
23103
23104
23105
23106
Зразок хворого

Рисунок 43. Рівні відносної експресії гену *OAS1* (2′-5′ oligoadenylate synthetase 1A (2′-5′ олігоаденілатсинтетаза 1A)) у клітинах периферичної крові пацієнтів з гострою формою COVID-19



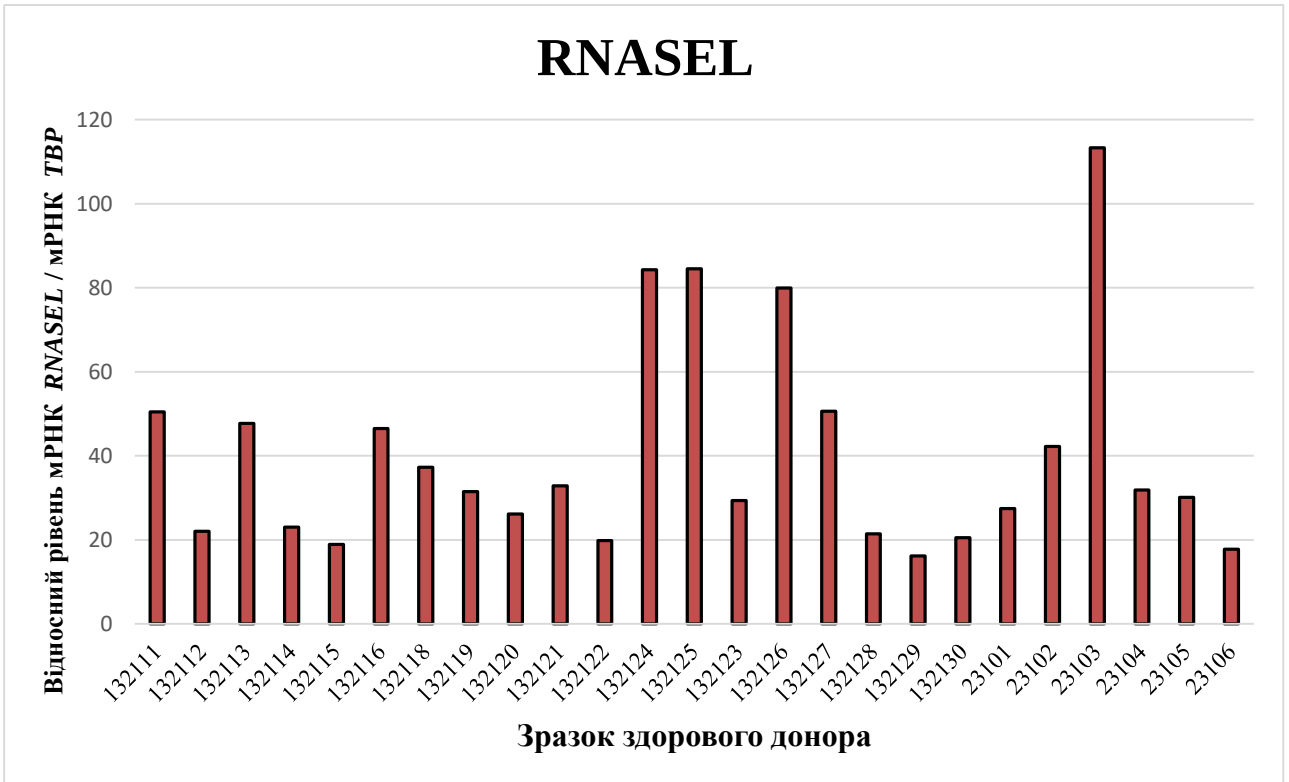


Рисунок 44. Рівні відносної експресії гену *RNASEL* (2′,5′-oligoisoadenylate synthetase-dependent ribonuclease L (рибонуклеаза L, 2′,5′-олігоаденілат залежна ендонуклеаза)) у клітинах периферичної крові пацієнтів з гострою формою COVID-19

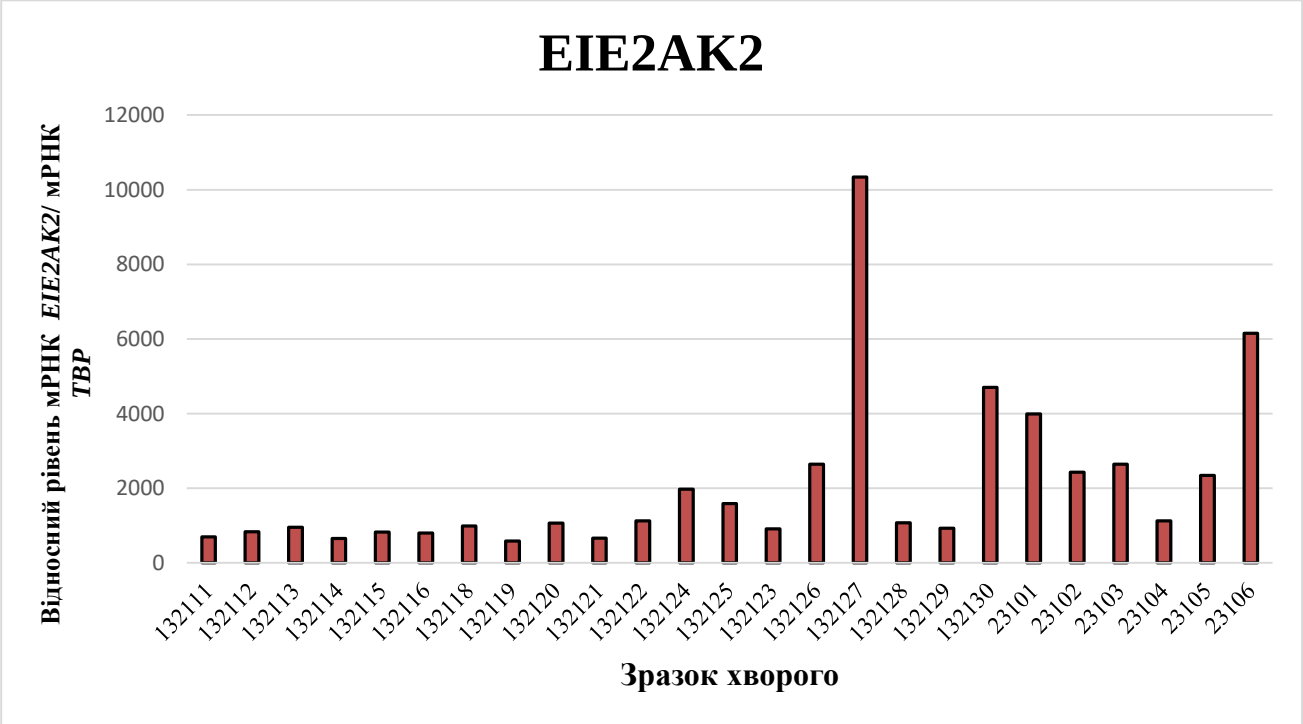
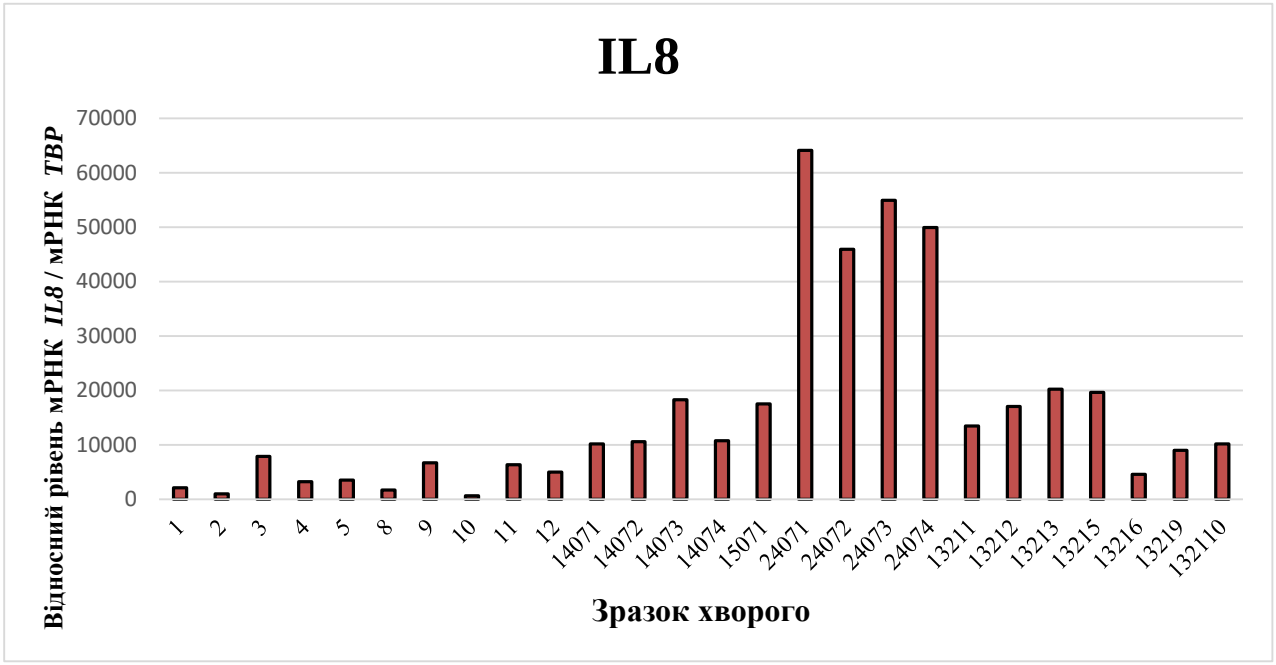


Рисунок 45. Рівні відносної експресії гену *EIE2AK2* (eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 2 (кіназа 2 еукаріотичного фактору ініціації трансляції 2-альфа)) у клітинах периферичної крові пацієнтів з гострою формою COVID-19



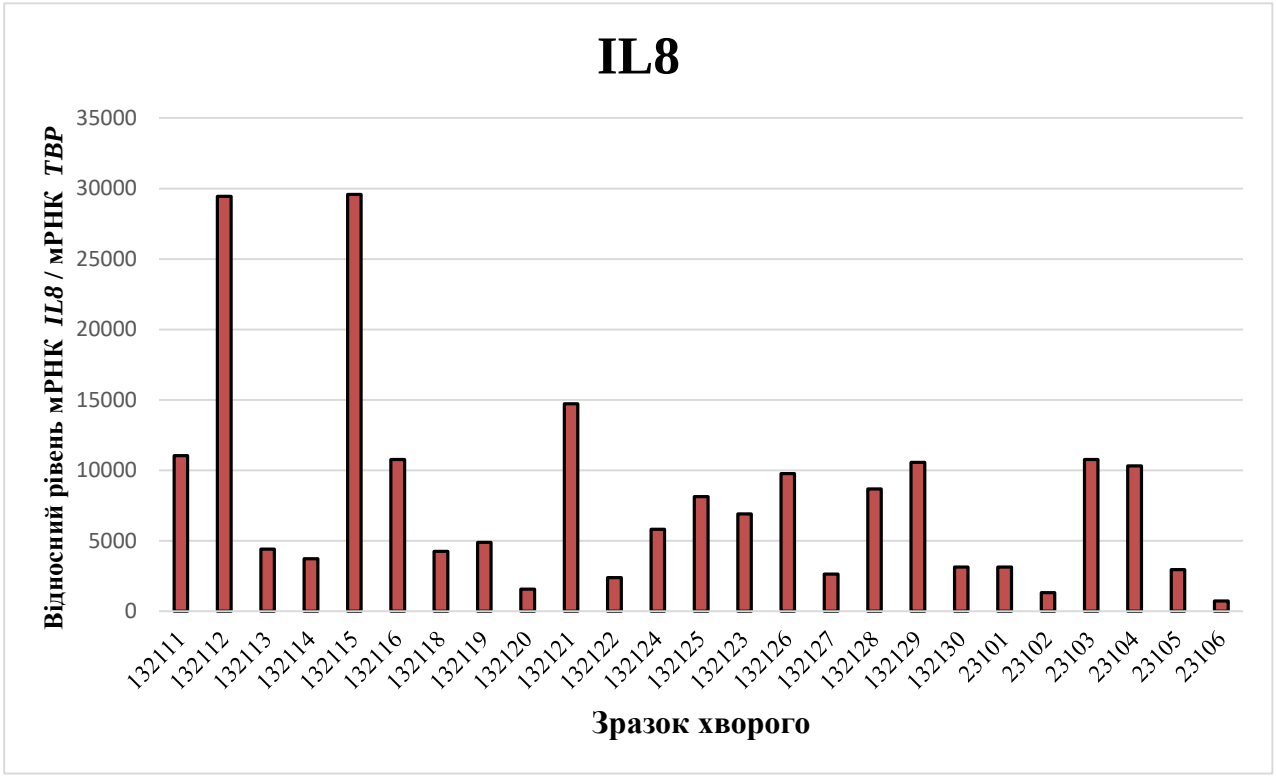


Рисунок 46. Рівні відносної експресії гену *IL8* (interleukin 8 (інтерлейкін 8)) у клітинах периферичної крові пацієнтів з гострою формою COVID-19

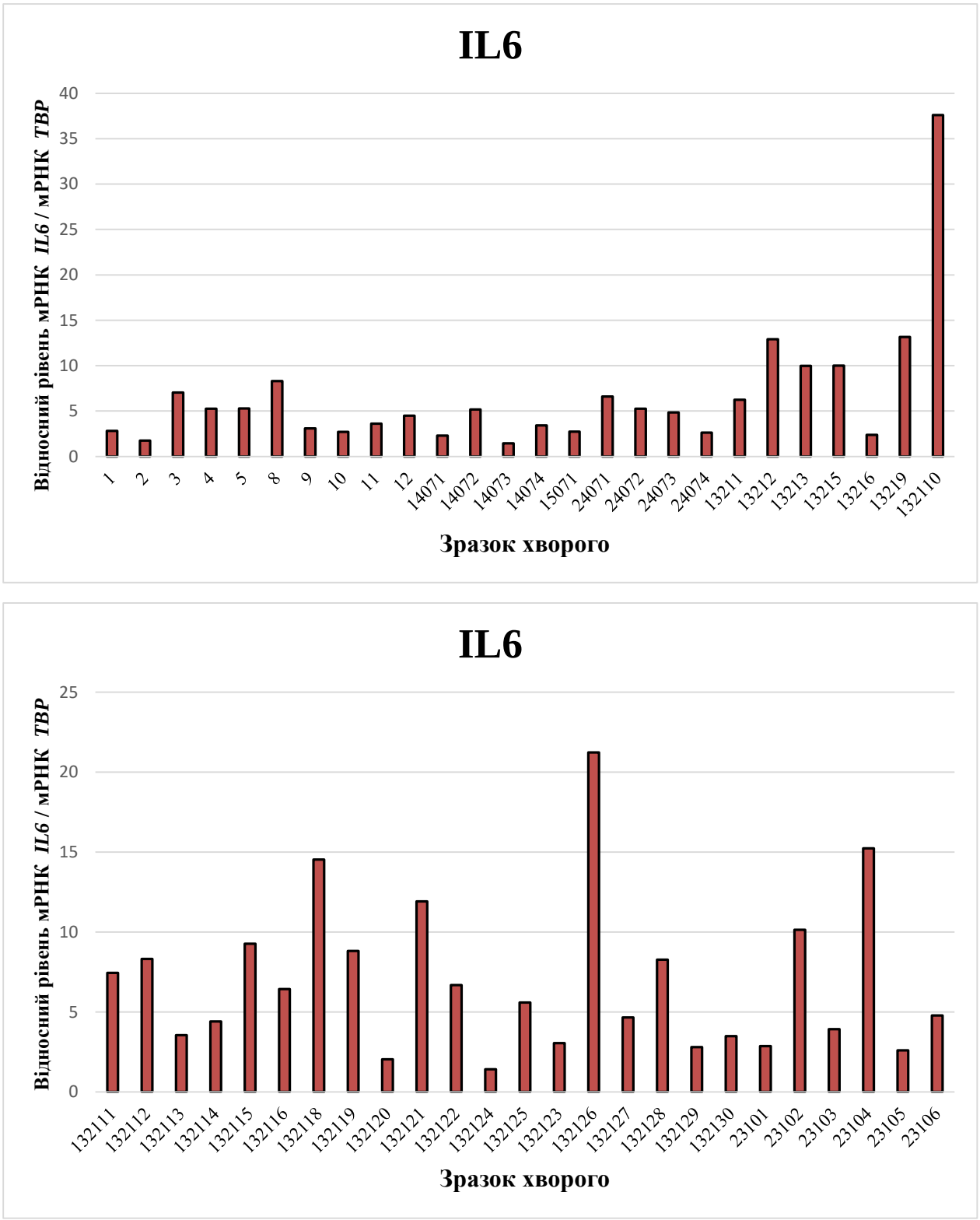
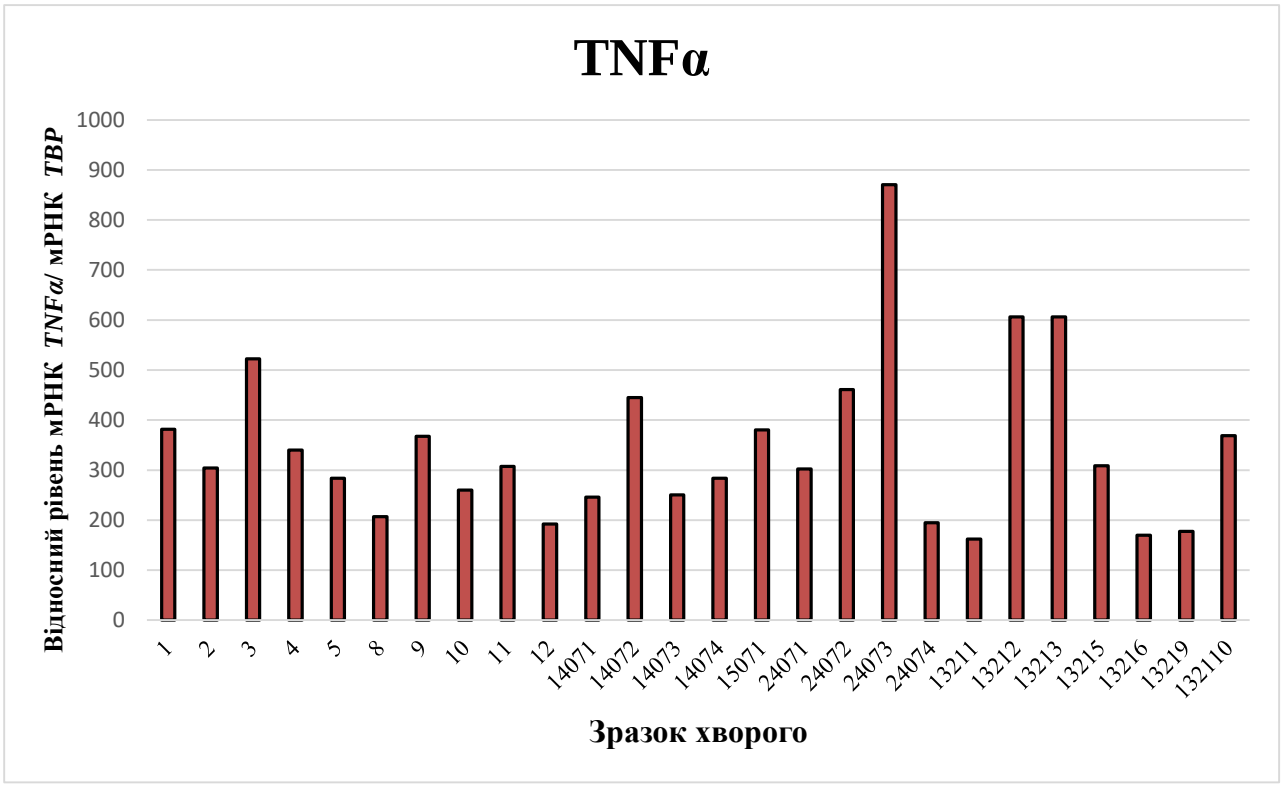


Рисунок 47. Рівні відносної експресії гену *IL6* (interleukin 6 (інтерлейкін 6)) у клітинах периферичної крові пацієнтів з гострою формою COVID-19



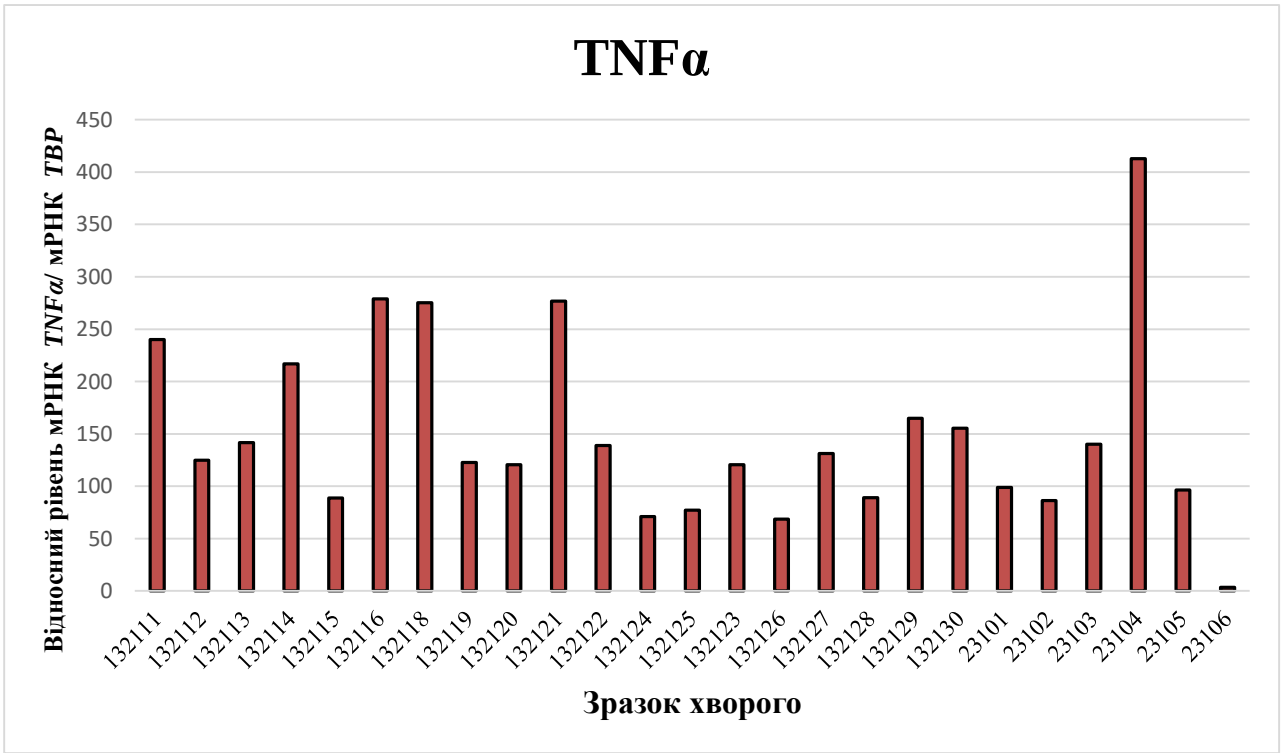
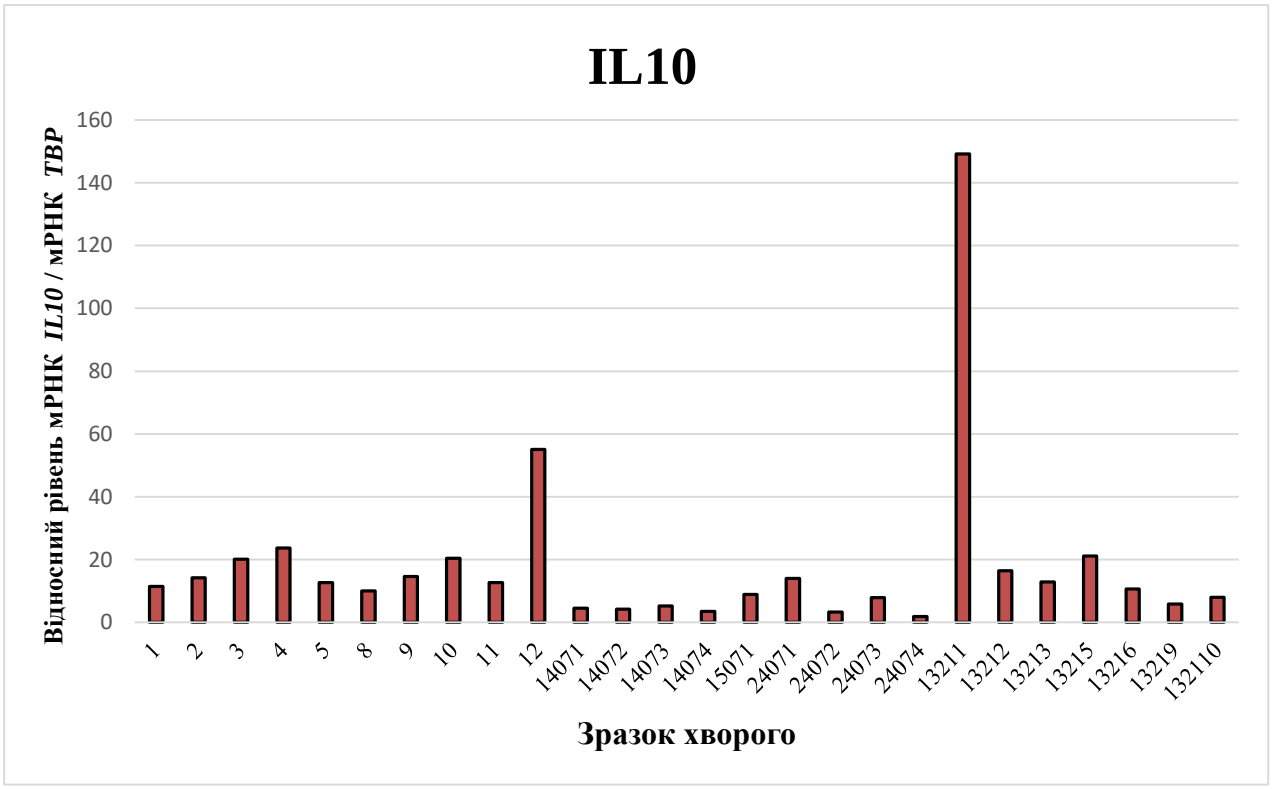


Рисунок 48. Рівні відносної експресії гену *TNFα* (tumor necrosis factor alpha (фактор некрозу пухлин альфа)) у клітинах периферичної крові пацієнтів з гострою формою COVID-19



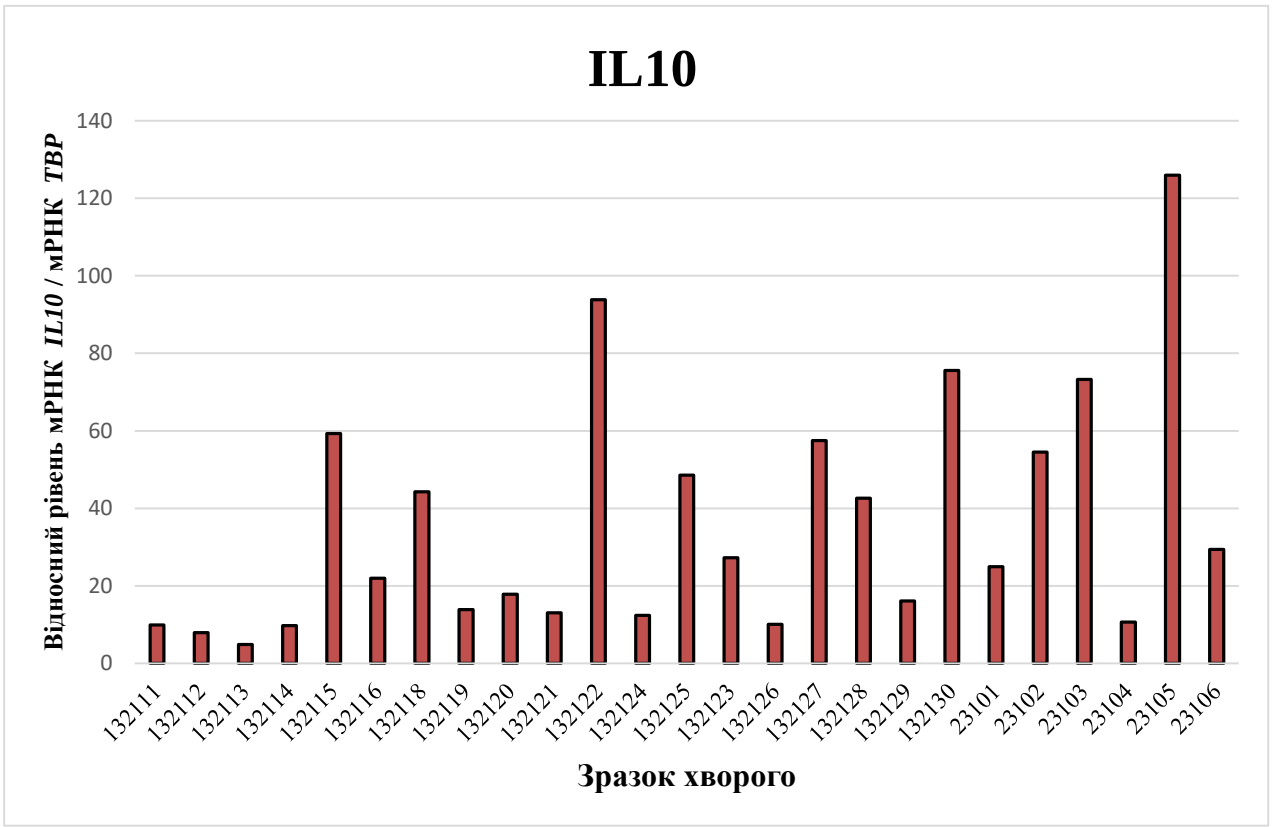
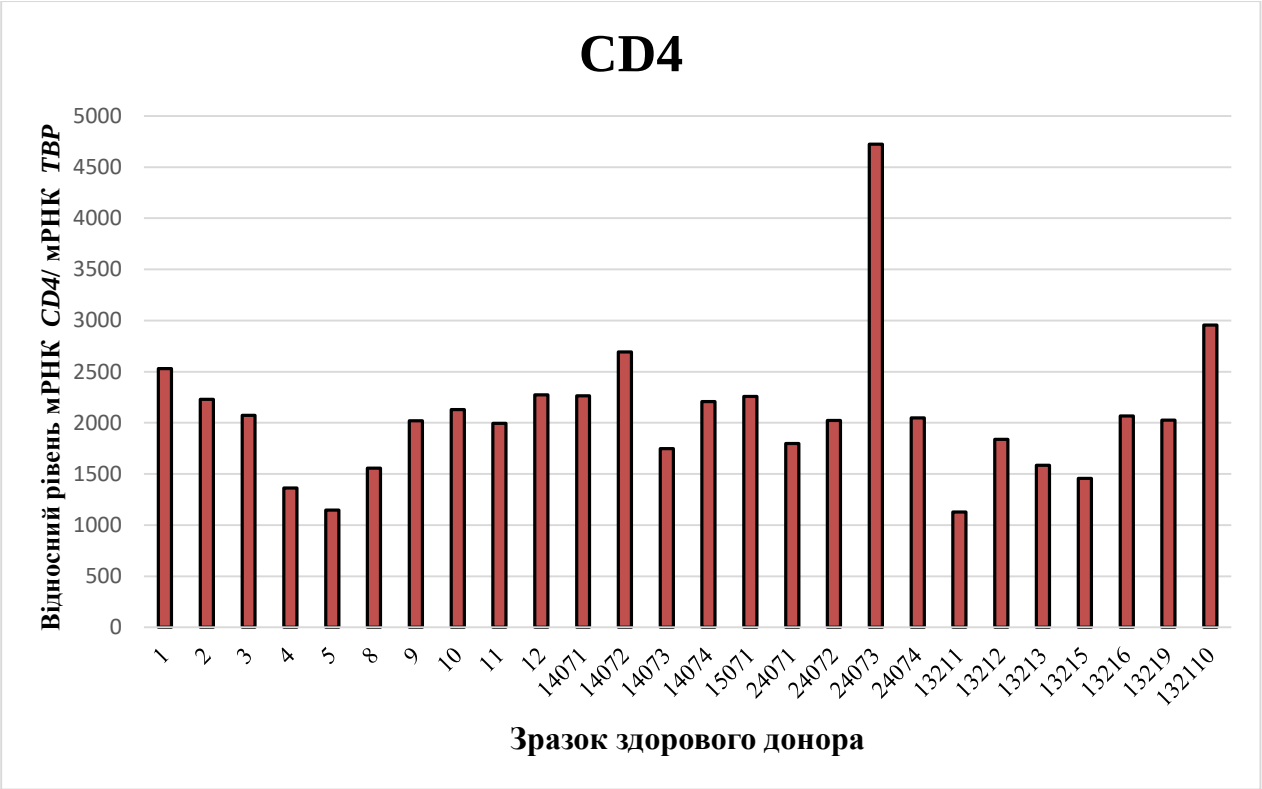


Рисунок 49. Рівні відносної експресії гену *IL10* (interleukin 10 (інтерлейкін 10)) у клітинах периферичної крові пацієнтів з гострою формою COVID-19



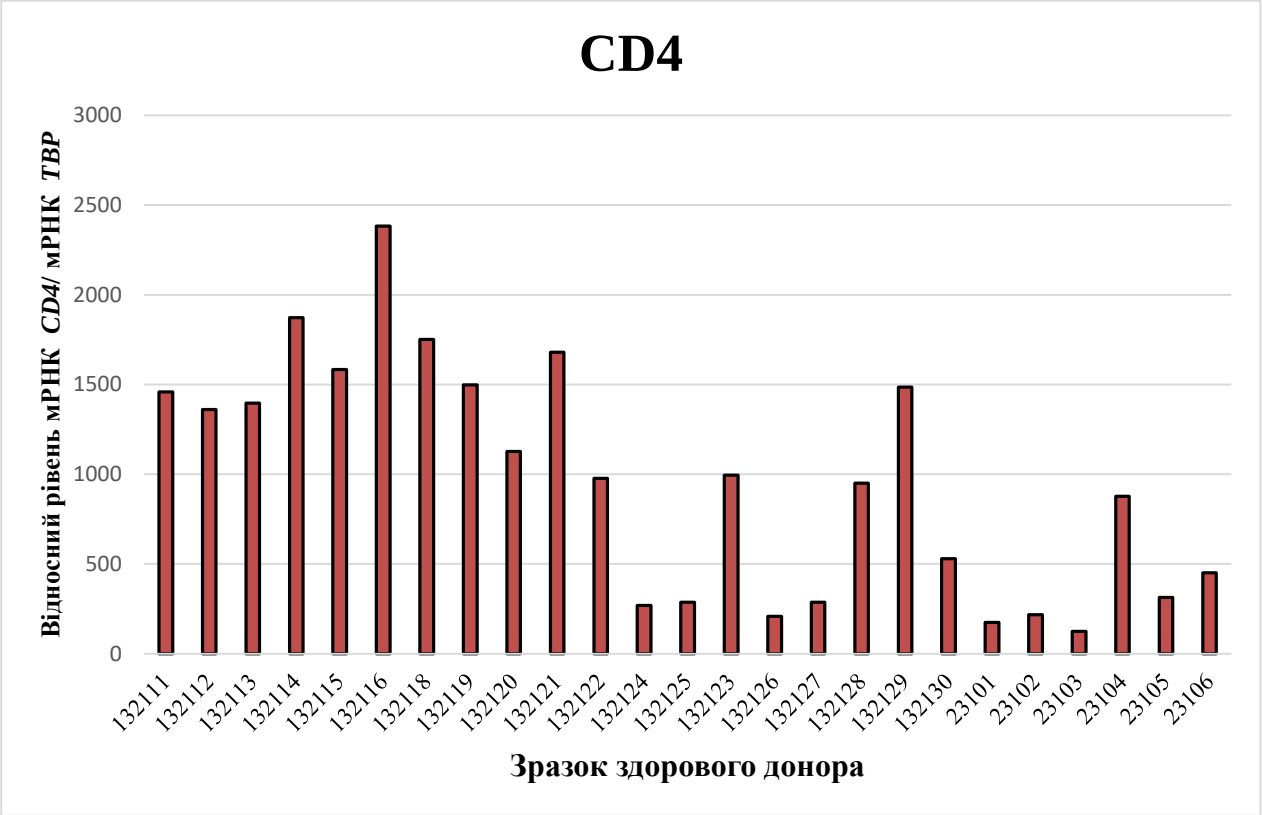
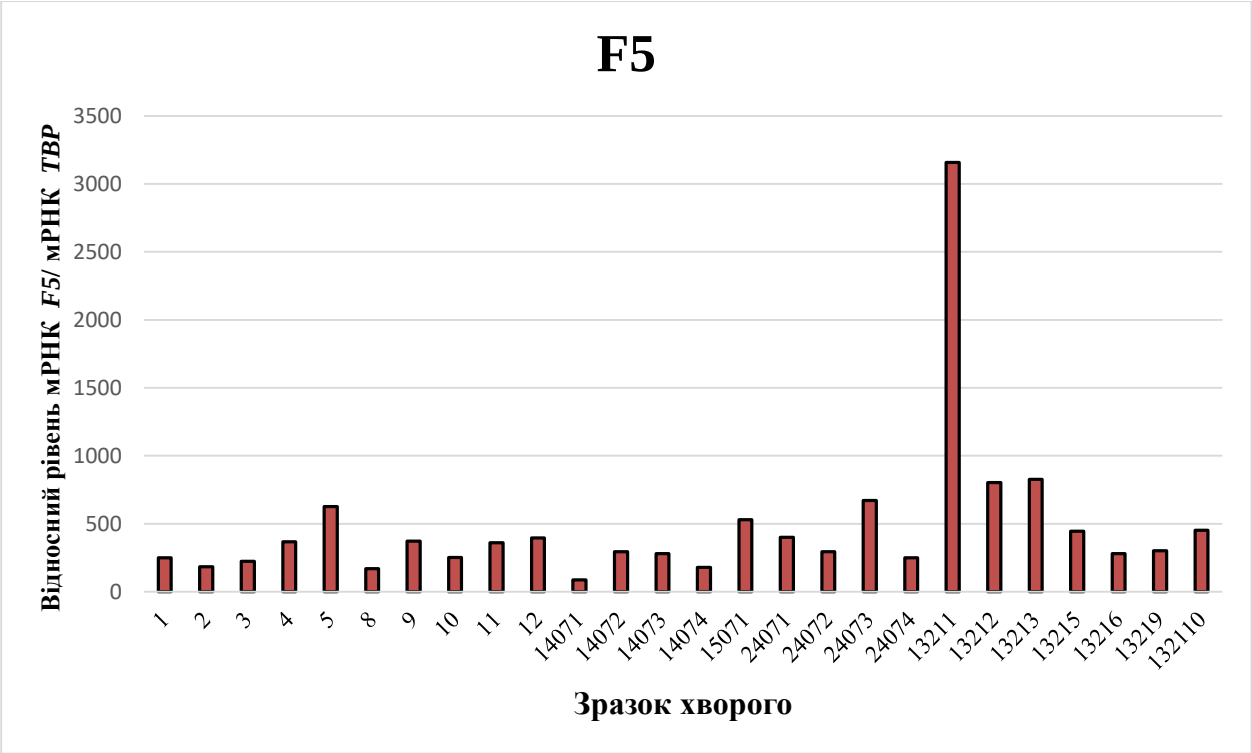


Рисунок 50. Рівні відносної експресії гену *CD4* (T-Cell Surface Glycoprotein CD4 (глікопротеїн CD4 на мембранні Т-лімфоцитів)) у клітинах периферичної крові пацієнтів з гострою формою COVID-19



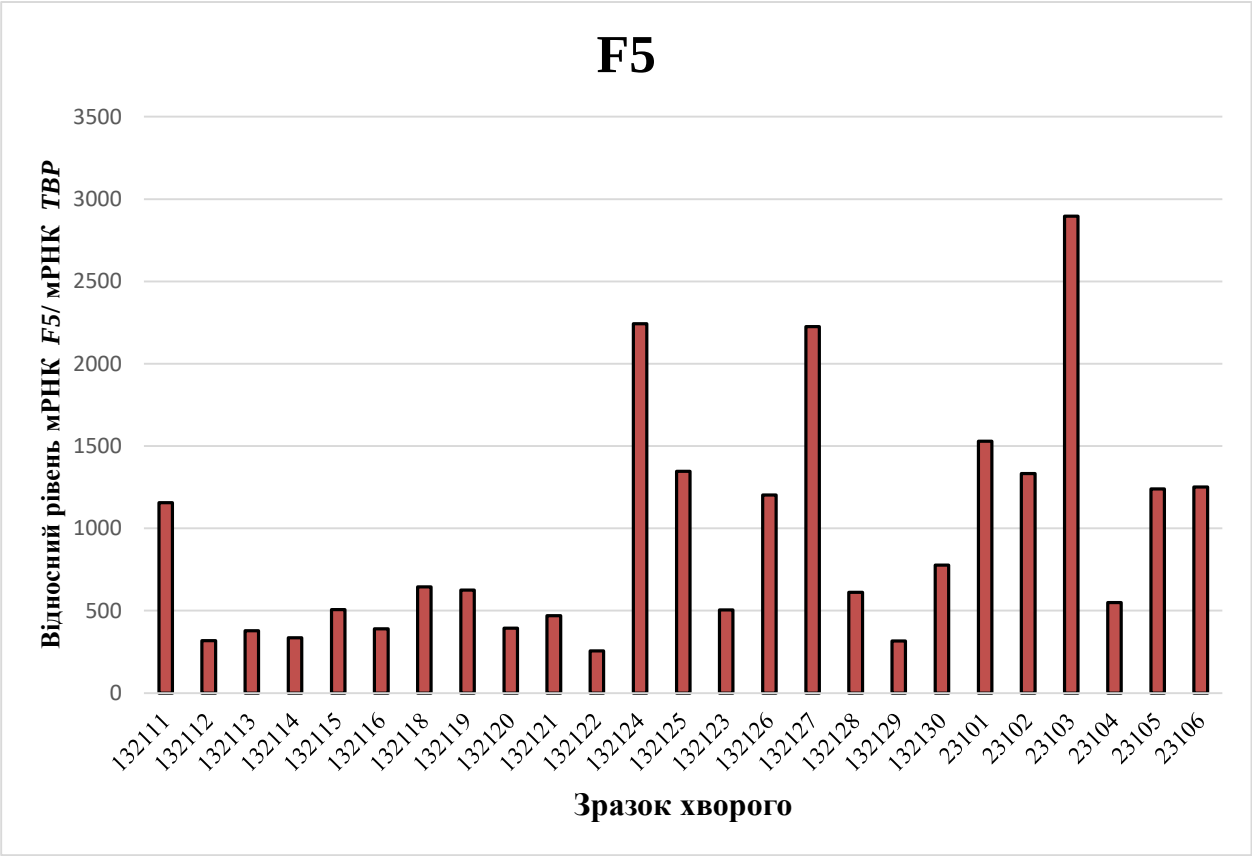


Рисунок 51. Рівні відносної експресії гену *F5* (coagulation factor V (фактор коагуляції 5)) у клітинах периферичної крові пацієнтів з гострою формою COVID-19

8.3. Статистичний аналіз результатів визначення рівнів відносної експресії генів у групі здорових донорів та хворих для розробки комбінованої експресійної тест-системи.

Клінічний перебіг COVID-19 варіюється від легких симптомів до гострого респіраторного дистрес-синдрому, гіперзапалення та порушення згортання крові [42]. Кровотворна система відіграє ключову роль у спостережені гіперзапалення та розладів згортання крові у хворих [43]. Аналіз експресії генів у периферичних клітинах крові є важливим для оцінки генів, пов'язаних із захворюванням та реакцією на ліки [44-49]. Тому в цьому дослідженні ми дослідили відносну експресію генів (*OAS1, RNASEL, MX1, EIE2AK2, IL8, IL6, TNFα, IL10, CD4, F5*) у периферичних клітинах крові пацієнтів з COVID-19 за допомогою ПЛР у реальному часі (Рис. 52-55).

Для аналізу статистичної достовірності між двома вибірками даних ПЛР в режимі реального часу ми використовували непараметричний U-критерій Манна-Уітні. Перевірку розподілу на нормальність здійснювали за допомогою тесту Д'Агостіно-Пірсона [50].

Вроджена імунна система клітин хазяїна розпізнає вірус за допомогою лімітованої кількості детерміновано закодованих патерн-розпізнавальних рецепторів викликаючи надмірну секрецію цитокінів [51]. Нами було встановлено, що відносна експресія цитокінів *IL8* ($P<0.01$), *IL6* ($P<0.01$), *IL10* ($P<0.0001$) на рівені мРНК підвищувався у периферичних клітинах крові у групі пацієнтів з гострою формою COVID-19 (COVID-19) у порівняні з групою здорових волонтерів (Контроль). Проте, відносна експресія гена *TNFα* залишалася статистично не зміною у пацієнтів з гострою формою COVID-19 у порівняні з контрольною групою (Рис.52).

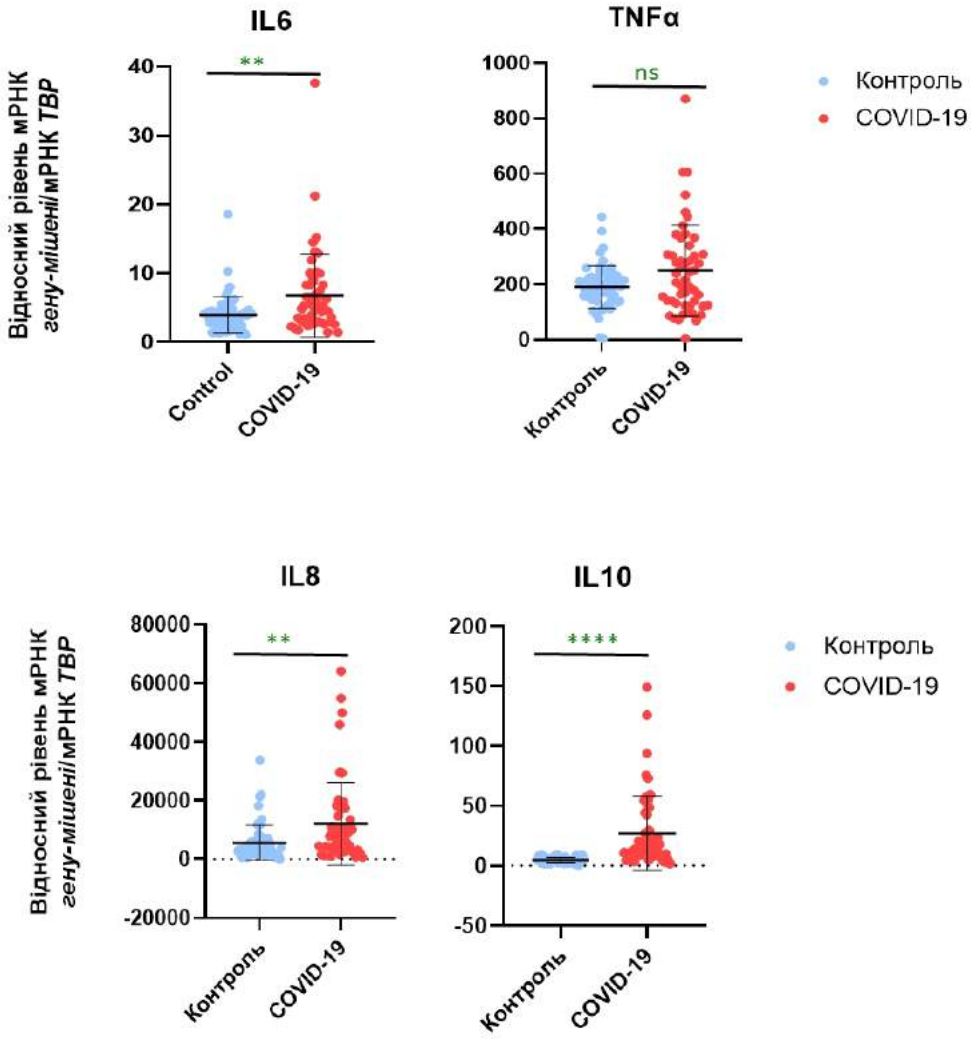


Рисунок 52. Рівні відносної експресії генів *IL6* (interleukin 6 (інтерлейкін 6)), *TNFα* (tumor necrosis factor alpha (фактор некрозу пухлин альфа)), *IL8* (interleukin 8 (інтерлейкін 8)) та *IL10* (interleukin 10 (інтерлейкін 10)) у периферичних клітинах крові пацієнтів з гострою формою COVID-19: Контоль – здорові волонтери, *n* = 59; COVID-19 – пацієнти з гострою формою COVID-19, *n* = 52: ****P<0.0001 vs. Контроль, **P<0.01 vs Контроль; ns – статистично не значущі vs. Контроль

Надпродукція цитокінів зумовлює противірусний стан клітини шляхом стимулювання експресії тисячі генів, які відомі як інтерферон-стимульовані гени (OAS/RNase L система, MX1 білок та PKR) [52, 53]. У даному досліджені нами було виявлено підвищення рівнів мРНК *OAS1* (P<0.0001), *RNASEL* (P<0.0001),

MX1 (P<0.0001), *EIE2AK2* (P<0.0001) у периферичних клітинах крові пацієнтів з гострою формою COVID-19 у порівняні з групою здорових волонтерів (Рис. 53).

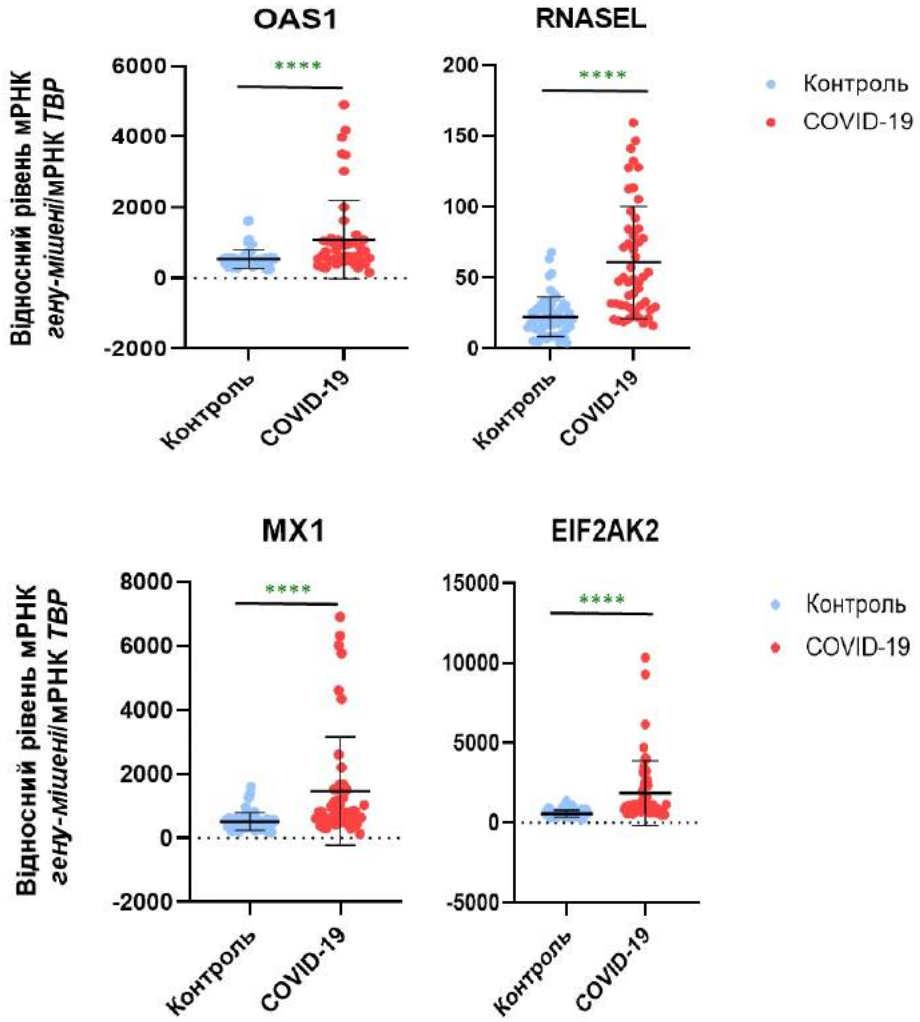


Рисунок 53. Рівні відносної експресії генів *OAS1* (2′-5′ oligoadenylate synthetase 1A (2′-5′ олігоаденілатсинтетаза 1А)), *RNASEL* (2′,5′-oligoisoadenylate synthetase-dependent ribonuclease L (рибонуклеаза L, 2′,5′-олігоаденілат залежна ендонуклеаза)), *MX1* (MX dynamin like GTPase 1 (гуанозинтрифосфат зв'язуючий білок Mx1)) та *EIF2AK2* (eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 2 (кіназа 2 еукаріотичного фактору ініціації трансляції 2-альфа)) у периферичних клітинах крові пацієнтів з гострою формою COVID-19: Контоль – здорові волонтери, *n* = 59; COVID-19 – пацієнти з гострою формою COVID-19 , *n* = 52: **** P<0.0001 vs. Контроль

Результати підвищення відносної експресії *OAS1*, *RNASEL*, *MX1*, *EIE2AK2*,

IL8, IL6, IL10 у периферичних клітинах крові пацієнтів з COVID-19 вказують стан гіперзапалення у досліджуваних пацієнтів та є потенційними кандидатами-біомаркерами для діаностування гіперзапалення хворих з COVID-19.

Індуковані вірусом дендритні клітини під час респіраторної інфекції мігрують до регіональних лімфатичних вузлів активуючи цитотоксичні (CD8+) та хелперні (CD4+) Т-клітини, а також рідкісні Т-клітини пам'яті, які здатні викликати адаптивну імунну відповідь [54]. Однак, нещодавні дослідження показують, що однією з характерних ознак інфекції SARS-CoV-2 є лімфопенія [55-57]. Лімфопенія пов’язана з тяжким перебігом захворюванням, але зникає, коли пацієнти одужують [57]. У деяких пацієнтів повідомлялося, що лімфопенія вражає CD4+ Т-клітини, CD8+ Т-клітини, В-клітини та клітини-кілери [56-58], тоді як інші дані свідчать про те, що інфекція SARS-CoV-2 має переважний вплив на CD8+ Т-клітини [59].

Досліджуючи експресію гену *CD4* у периферичних клітинах крові пацієнтів з гострою формою COVID-19, нами було виявлено зниження рівня мРНК цього гену ($P<0.001$) у порівняні з контрольною групою (Рис.54). Повідомлялося також, що при тяжкому перебігу захворювання COVID-19, лімфопенія може бути пов’язана з високим рівнем IL-6, IL-10 [56-60] потенційно через прямий вплив цих цитокінів на популяції Т-клітин [61, 62] та/або непрямий впливають через інші типи клітин, такі як дендритні клітини та нейтрофіли [63, 64]. Отримані нами результати віносної експресії генів *IL-6, IL-10* та *CD4* на рівні мРНК у периферичних клітинах крові пацієнтів з гострою формою COVID-19 узгоджуються з літературними даними [55-60] вказуючи на те, що аналіз експресії генів *(IL-6, IL-10, CD4*) у периферичних клітинах крові може використовуватися для діагностування лімфопенії у пацієнтів при тяжкому перебігу COVID-19 та оцінювати ефективність його лікування.

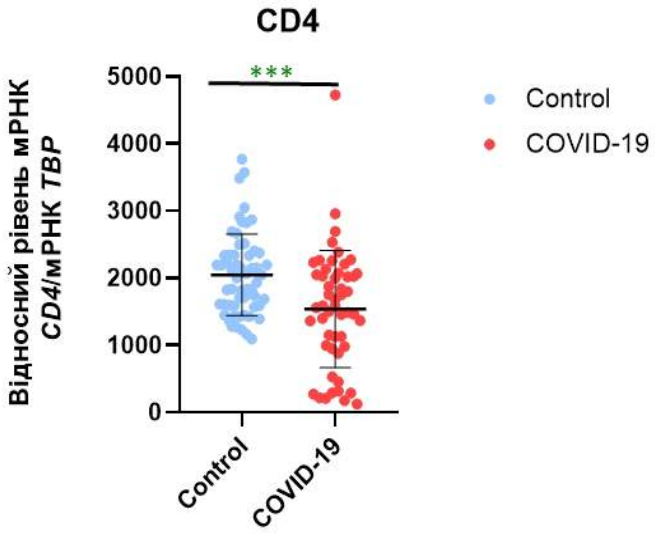


Рисунок 54. Рівні відносної експресії генів *CD4* (T-Cell Surface Glycoprotein CD4 (глікопротеїн CD4 на мембранні Т-лімфоцитів)) у периферичних клітинах крові пацієнтів з гострою формою COVID-19: Контоль – здорові волонтери, *n* = 59; COVID-19 – пацієнти з гострою формою COVID-19 , *n* = 52: ***P<0.001 vs. Контроль

Пацієнти з COVID-19 мають вищий ризик розвитку тромбів (тромбозу) переважно в легенях, що пов'язано з більш високою смертністю [65]. У ~70% пацієнтів з COVID-19, які померли, мали дисеміноване внутрішньосудинне згортання крові [66]. Тромби можуть бути у венозному та артеріальному кровообігу, у дрібних кровоносних судинах. Гіперкоагуляційний стан при COVID-19 було підтверджено у ряді досліджень, у яких були виявлені вищі рівні D-димеру, фібриногену та продуктів розпаду фібриногену [67], подовжений протромбіновий час, міжнародне нормалізоване співвідношення, і тромбіновий час у пацієнтів з COVID-19 [68].

У периферичних клітинах крові пацієнтів з гострою формою COVID-19 було виявлено підвищену відносну експресію гену *F5* (P<0.0001), який кодує фактор коагуляції 5, у порівняні з групою здорових волонтерів (Рис. 55). Результати дослідження свідчать, що SARS-CoV-2-індукована відносна експресія гену *F5* у периферичних клітинах крові може використовуватися для діагностування гіперкоагуляції у пацієнтів з з COVID-19.

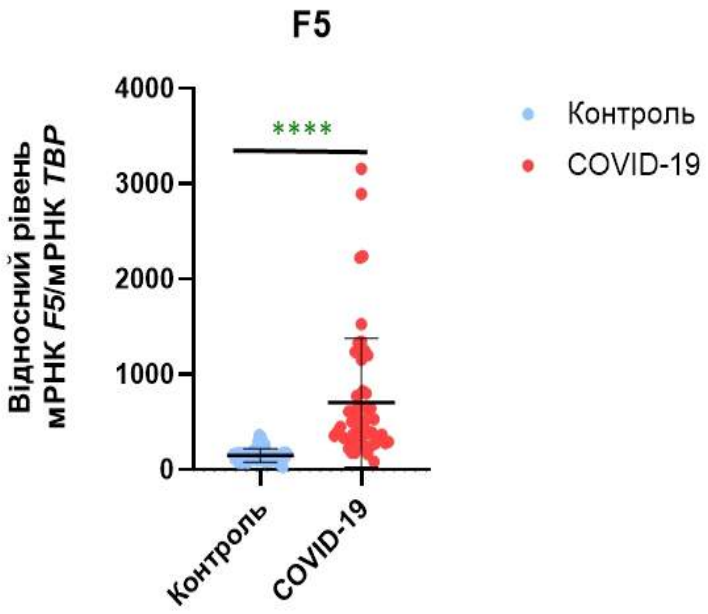


Рисунок 55. Рівні відносної експресії генів *F5* (coagulation factor V (фактор коагуляції 5)) у периферичних клітинах крові пацієнтів з гострою формою COVID-19: Контоль – здорові волонтери, *n* = 59; COVID-19 – пацієнти з гострою формою COVID-19 , *n* = 52: **** P<0.0001 vs. Контроль

Аналіз результатів ПЛР вказує на статистично достовірну дисрегуляцію експресії генів *OAS1*, *RNASEL*, *MX1*, *EIE2AK2*, *IL8*, *IL6*, *IL10*, *CD4*, *F5* у периферичних клітинах крові пацієнтів з гострою формою COVID-19. Отримані результати відносної експресії вказують на те, що гени *OAS1*, *RNASEL*, *MX1*, *EIE2AK2*, *IL8*, *IL6*, *IL10*, *CD4*, *F5* є потенційними біомаркерами для розробки комбінованої експресійної тест-системи для діагностики гіперзапалення, гіперкоагуляції та лімфопенії у периферичних клітинах крові пацієнтів з COVID-19.

8.4. Біоінформатичний аналіз результатів (MDR аналіз) визначення рівнів відносної експресії генів у групі здорових донорів та хворих та детекція генів маркерів для комбінованої екпрсесійної тест-системи

Для біоінформатичного аналізу результатів між двома вибірками даних ПЛР в режимі реального часу ми використовували Multifactor dimensionality reduction (MDR) аналіз. Метод машинного навчання, MDR аналіз був

розроблений для виявлення та моделювання епістазу [69]. Однак раніше було модифіковано алгоритм підготовки даних відносної експресії генів для розробки наборів експресійних біомаркерів за допомогою MDR аналізу для діагностики пухлин передміхурової залози [70].

На першому етапі MDR аналізу ми провели визначення порогових значеннь рівнів відносної експресії та перевили їх у бінарні значення за результатами описової статистики (Табл. 8).

Таблиця 8

Дані описової статистики рівнів відносної експресії досліджуваних генів у периферичних клітинах крові здорових волонтерів (Контроль) та пацієнтів з гострою формою COVID-19 (COVID-19)

Ген	Дослідна група	Мінімум	25% персентиль	Медіана	75% персентиль	Максимум
OAS1	Контроль	240,3	400,8	472,2	572,5	1632
	COVID-19	153,5	476,4	624,2	1066	4902
RNASEL	Контроль	3,958	13,13	20,27	29,12	67,87
	COVID-19	16,17	29,07	48,32	84,35	159,4
MX1	Контроль	181,2	337,1	461	629,1	1607
	COVID-19	135,4	556,5	812,2	1523	6903
EIF2AK2	Контроль	245	433,4	514,6	623,9	1348
	COVID-19	505,6	721,7	1033	2344	10342
IL6	Контроль	1,049	2,496	3,722	4,515	18,58
	COVID-19	1,41	2,872	5,175	8,316	37,61
TNFα	Контроль	3,353	147	186,2	223,5	443,8
	COVID-19	3,573	124,9	216,8	308,3	870,6
IL8	Контроль	123,6	2385	4038	6031	33809
	COVID-19	652,4	3221	8125	13449	64104
IL10	Контроль	0,2616	3,085	4,422	5,905	9,25
	COVID-19	1,852	9,74	14	29,38	149,2
CD4	Контроль	1088	1588	2001	2345	3767
	COVID-19	124,5	977,1	1583	2066	4725
F5	Контроль	28,1	106	129,1	178,7	365,5
	COVID-19	85,84	295,1	443,9	803,2	3157

За результатами U-критерія Манна-Уітні статистично не достовірними були дані відносної експресії гену *TNFα* (Рис.52). Однак ми також провели множиний t-тест для аналізу статистичної достовірності між двома вибірками даних ПЛР в режимі реального часу. Статистичний аналіз за результатами тесту Дана-Бонферроні для множинних порівнянь показав статистично достовірну різницю відносної експресії генів *RNASEL, MX1, EIE2AK2, IL8, IL6, IL10, CD4, F5* та не статистичну достовірність різницю відносної експресії генів *TNFα* та *OAS1* у периферичних клітинах крові пацієнтів з гострою формою COVID-19 у порівняні з контрольною групою (Табл. 9). Тому для даних відносної експресії генів *TNFα* та *OAS1* не було проведено MDR аналіз.

Таблиця 9

Відмінності відносної експресії генів згідно тесту Дана-Бонферроні для множинних порівнянь

Ген	Тест Дана-Бонферроні для множинних порівнянь P<0.05
F5	0,00000008
MX1	0,007
OAS1	0,1
IL8	0,01
IL6	0,01
TNFa	0,1
RNASEL	0,0000005
CD4	0,004
IL10	0,000003
EIF2AK2	0,00004

Для переводу у дихотомічний тип даних використовували різницю медіан відносних експресій між контрольною групою та групою хворих 2 рази. При чому для усіх генів, окрім *CD4* рівні відносної експресії у хворих були підвищеними у порівнянні з контролем, тоді як для ген *CD4* рівень відносної експресії у хворих був навпаки значуще зниженим у порівнянні з контрольною групою.

MDR аналіз було проведено для 8 генів *RNASEL, MX1, EIE2AK2, IL8, IL6,*

IL10, CD4, F5, який показав 4 гени (*MX1, EIE2AK2, F5* та *IL10*) на дендрограмі з високим рівнем передбачуваності у прогнозі та кореляцію між ними (Рис. 56).

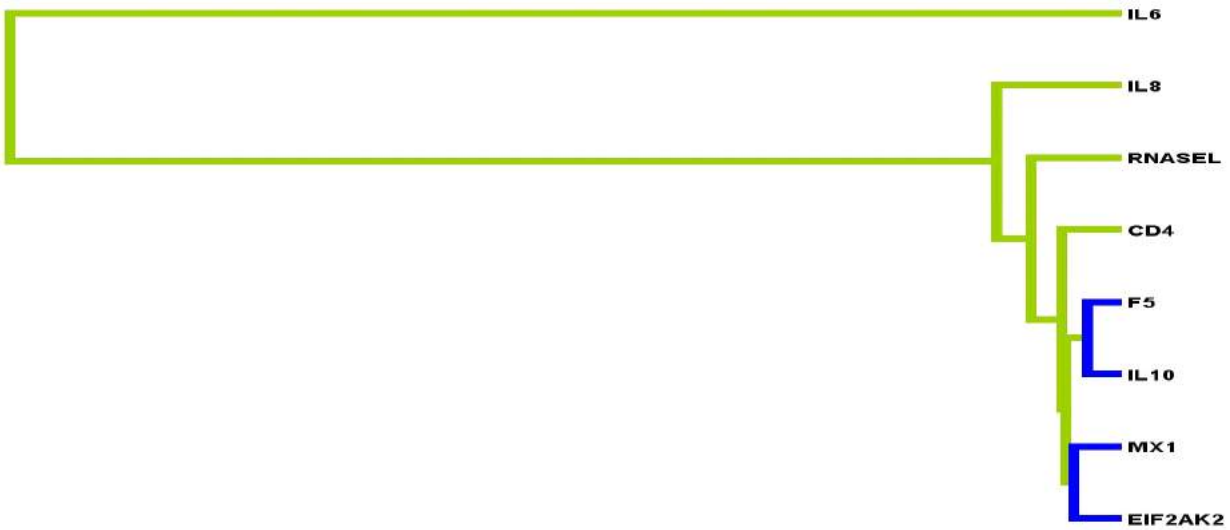


Рисунок 56. Дендрограма взаємовідносин генів *RNASEL, MX1, EIE2AK2, IL8, IL6, IL10, CD4, F5* за допомогою MDR аналізу: сині лінії – найбільш сильні гени-предиктори

Перехресні перевірки за допомогою MDR аналізу виявили кращі моделі наборів генів за статистичними параметрами (Табл. 10). Проте відмінні діагностичні параметри було виявлено для набору генів *F5, MX1, CD4*, тоді як в інших запропонованих наборах генів діагностичні параметри були добрими. Отримані результати відносної експресії MDR аналізу вказують на те, що *RNASEL, MX1, EIE2AK2, IL8, IL6, IL10, CD4, F5* є експресійними біомаркерами для діагностування гіперзапалення, гіперкоагуляції та лімфопенії у периферичних клітинах крові пацієнтів з COVID-19.

Таблиця 10

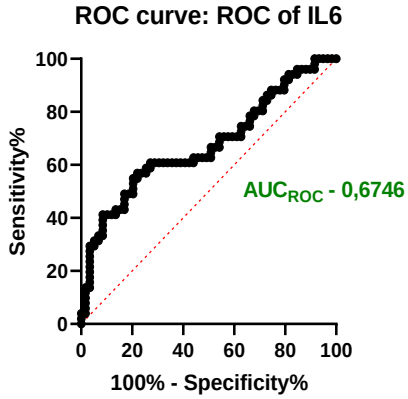
Статистичні параметри кращих моделей наборів генів, пов'язаних з імунопатологією COVID-19

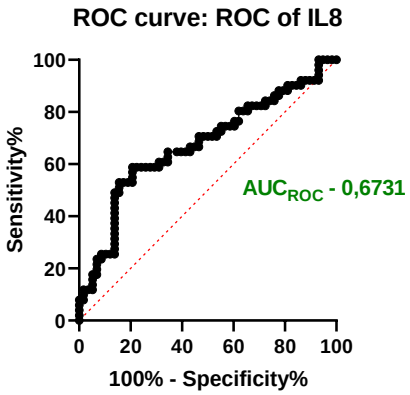
Набори генів	Статистичні параметри
F5, EIF2AK2	Accuracy: 0,8818 Sensitivity: 0,9216 Specificity: 0,8475 Odds Ratio:65,2778 (18,828,226,322) X^2: 64,7315 ($p < 0,0001$)

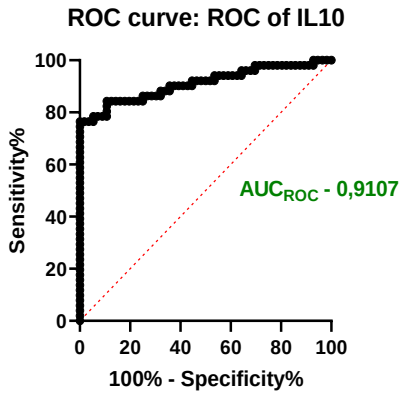
F5, MX1, CD4	Accuracy: 0,9 Sensitivity: 0,9216 Specificity: 0,8814 Odds Ratio:87,2857 (24,0206,317,178) X^2: 70,5639 ($p < 0,0001$)
F5, MX1, CD4, EIF2AK2	Accuracy: 0,8818 Sensitivity: 0,9216 Specificity: 0,8475 Odds Ratio:65,2778 (18,828,226,322) X^2: 64,7315 ($p < 0,0001$)
F5, MX1, RNASEL, CD4, IL10	Accuracy: 0,8636 Sensitivity: 0,9804 Specificity: 0,7627 Odds Ratio:160,7143 (20,3127,1 271,572) X^2: 62,0835 ($p < 0,0001$)
F5, MX1, RNASEL, CD4, IL10, EIF2AK2	Accuracy: 0,8455 Sensitivity: 0,9804 Specificity: 0,7288 Odds Ratio:134,375 (17,1089,1 055,3954) X^2: 57,3275 ($p < 0,0001$)
F5, MX1, IL8, IL6, CD4, IL10, EIF2AK2	Accuracy: 0,7818 Sensitivity: 0,9804 Specificity: 0,6102 Odds Ratio:78,2609 (10,1003,606,3919) X^2: 42,7386 ($p < 0,0001$)

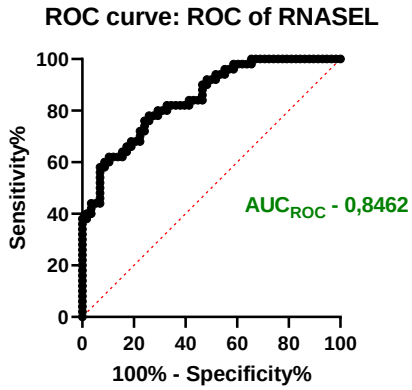
Додатково, щоб визначити наскільки рівень експресії генів-біомаркерів може розрізняти зразки з імунопатологічними наслідками COVID-19 (гіперзапалення, гіперкоагуляцію та лімфопенію) від зразків здорових волонтерів, нами також було проведено ROC-аналіз з використанням програмного забезпечення GraphPad Prism 8. Діагностичним параметром ROC-аналізу є площа під кривою ROC (AUC_{ROC}) [71]. ROC-Аналіз відносної експресії генів у периферичних клітинах крові пацієнтів з COVID-19 виявив відмінний діагностичний показник AUC_{ROC} для генів *EIE2AK2, F5* та *IL10* (Рис.57). Загалом дані ROC-аналізу показали тенденцію як під час MDR аналізу. Узагальнюючи

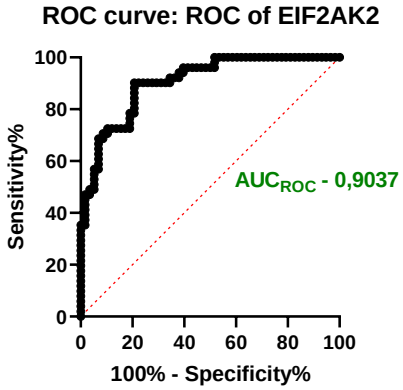
отримані результати ми виявили, що найкращими кандидатами-біомаркерами для експрес тест-системи є гени *F5*, *MX1*, *RNASEL*, *CD4*, *IL10*, *EIF2AK2*.











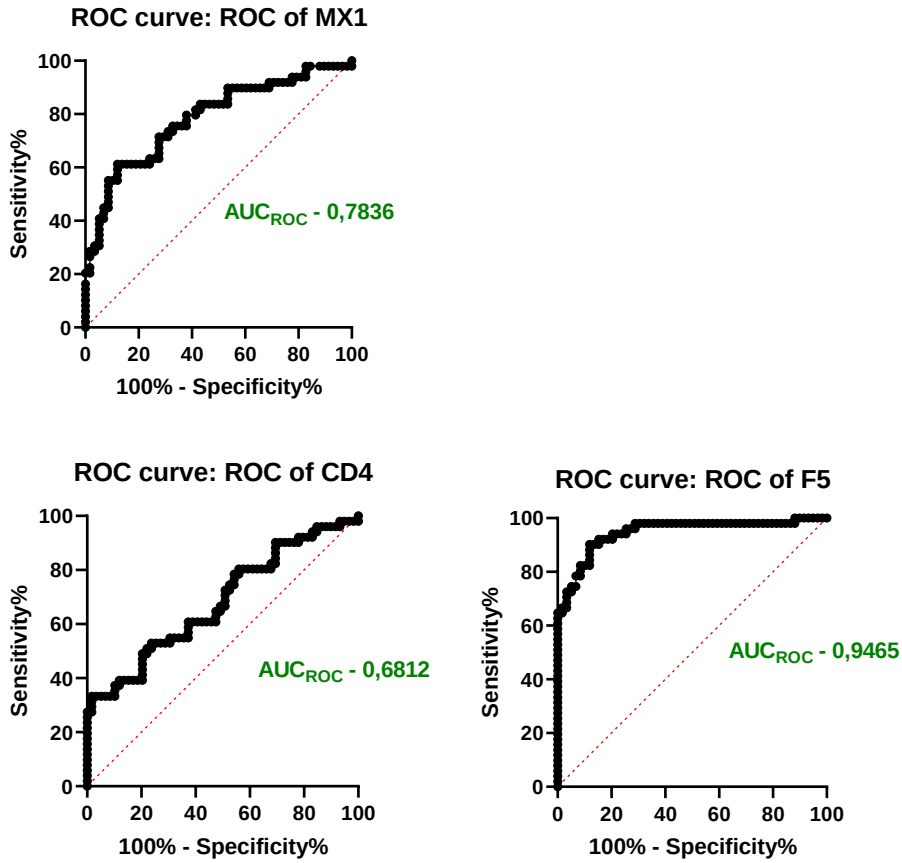


Рисунок 57. Крива ROC діагностичної цінності експресії генів *RNASEL*, *MX1*, *EIE2AK2*, *IL8*, *IL6*, *IL10*, *CD4*, *F5* у периферичних клітинах крові пацієнтів з гострою формою COVID-19: ROC - receiver operating characteristic; AUC_{ROC} - площа під кривою ROC

Найвищі показники чутливості, специфічності та точності виявлено для комбінації трьох експресійних біомаркерів: *F5*, *MX1*, *CD4* (Ac.0,9; Se.0,92; Sp.0,88), тоді як найвищий показник прогностичної цінності набору біомаркерів (OR) має комбінація з 6-и генів: *F5*, *MX1*, *RNASEL*, *CD4*, *IL10*, *EIF2AK2* (OR=134,37).

8.5. Інтерпретація тестування експресійної тест-системи.

Відомо 4 різних діагностичних рівнів біомаркерів/панелей біомаркерів: відмінна, хороша, погана і не має діагностичної цінності [71] (Табл. 11). Для експресійної тест-системи ми обирали набори генів, які мали відміні та хороші діагностичні параметри (Табл. 10).

Таблиця 11

Відповідність між точністю, чутливістю, специфічністю та площею під кривою ROC та діагностичною цінністю біомаркера

Діагностична цінність біомаркера	Точність (Accuracy)	Чутливість (Sensitivity)	Специфічність (Specificity)	Площа під кривою ROC
Відмінна	>0.9	>0.9	>0.9	>0.9
Хороша	0.75-0.9	0.75-0.9	0.75-0.9	0.75-0.9
Погана	0.50-0.75	0.50-0.75	0.50-0.75	0.5-75
Не має	0.50	0.50	0.50	0.5

Інтерпретація результатів аналізу з використанням експрес тест-системи відіграє суттєве значення при ранній діагностиці імунопатологій COVID-19 (гіперкоагуляція, гіперзапалення чи лімфопенія) [72]. Завдяки методів машинного навчання та моделей діагностування необхідно створити програму, яка буде містити прописані параметри та діапазони змін експресії відібраних генів, які характеризують нормальні та імунопатологічні стани у пацієнтів з COVID-19.

РОЗДІЛ 9. ЗБІР ПЛР ТА КОМБІНОВАНИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ВІРУСНИХ ПАТОГЕНІВ ТА ЕКСПРЕСІЙНОЇ СИСТЕМИ (УЗАГАЛЬНЕННЯ УСІХ РЕЗУЛЬТАТІВ) ТА РОЗРОБКА ПРОТОКОЛІВ

9.1. Порівняння ПЛР та комплексних тест-систем для визначення SARS-CoV-2 та інших респіраторних вірусів.

У результаті виконання даного проєкту нами було відпрацьовано 7 різних прототипів тест систем, зокрема дві комбінованих тест-системи (Табл. 12):

Тест 1. Двокрокова ПЛР з виділенням РНК та синтезом кДНК з використанням кПЛР на основі інтеркалюючого флуоресцентного барвника;

Тест 2. Пряма детекція вірусу SARS-CoV-2 без виділення РНК з використанням однокрокової кПЛР на основі інтеркалюючого флуоресцентного барвника;

Тест 3а. Пряма детекція вірусу SARS-CoV-2 без виділення РНК з використанням ізотермічної полімерази BstIII у якості ревертази та кПЛР з інтеркалюючим флуоресцентним барвником (або ПЛР хроматографічною детекцією (**Тест 3б**);

Тест 4. Двокрокова ПЛР з виділенням РНК та синтезом кДНК з використанням ПЛР з хроматографічною детекцією;

Тест 5. Комбінована тест-система для детекції вірусів SARS-CoV-2 та грипу

Тест 6. Комбінована тест-система для детекції семи вірусів при ГРВІ

Таблиця 12

Порівняльна характеристика запропонованих тест-систем для детекції вірусних патогенів

Тест	**Етапи виконання**	**Собівартість реактивів на 100 реакцій** (приблизна)	**Час на виконання тесту**	**Прилад**
Тест 1. Двокрокова ПЛР з виділенням РНК та синтезом кДНК з використанням кПЛР на основі	1. Виділення РНК 2. Синтез кДНК 3. Кількісна ПЛР	75500 грн (**60000**+ 12000+ 1500+2000)	6 годин	кПЛР у реальному часі

інтеркалюючого флуоресцентного барвника	4. Аналіз результатів			
Тест 2. Пряма детекція вірусу SARS-CoV-2 без виділення РНК з використанням однокрокової кПЛР на основі інтеркалюючого флуоресцентного барвника	1. Підготовка зразка 2. Однокрокова кількісна ПЛР 2. Аналіз результатів	14000	3 години	кПЛР у реальному часі
Тест 3. Пряма детекція вірусу SARS-CoV-2 без виділення РНК з використанням ізотермічної полімерази BstIII у якості ревертази та кПЛР з інтеркалюючим флуоресцентним барвником	1. Підготовка зразка 2. Синтез кДНК з BstIII 3. Кількісна ПЛР 2. Аналіз результатів	4000 грн	4 години	кПЛР у реальному часі
Тест 3б. Пряма детекція вірусу SARS-CoV-2 без виділення РНК з використанням ізотермічної полімерази BstIII у якості ревертази, ПЛР та хроматографічна детекція	1. Підготовка зразка 2. Синтез кДНК з BstIII 3. ПЛР 2. Хромато-графічна детекція	5000 грн	4 години	Термоциклер
Тест 4. Двокрокова ПЛР з виділенням РНК та синтезом кДНК з використанням	1. Виділення РНК 2. Синтез кДНК 3. ПЛР	75000 грн (60000+ 12000+ 1000+2000)	6 годин	Термоциклер

ПЛР з хроматографічною детекцією	4. Хромато-графічна детекція			
Тест 5. Комбінована тест-система для детекції вірусів SARS-CoV-2 та грипу	1. Виділення РНК 2. Синтез кДНК 3. Кількісна ПЛР 4. Аналіз результатів	75500 грн (**60000**+ 12000+ 1500+2000)	6 годин	кПЛР у реальному часі
Тест 6. Комбінована тест-система для детекції семи вірусів при ГРВІ	1. Виділення РНК 2. Синтез кДНК 3. Кількісна ПЛР 4. Аналіз результатів	75500 грн (**60000**+ 12000+ 1500+2000)	6 годин	кПЛР у реальному часі

Усі варіанти тестів на детекцію вірусу SARS-CoV-2 є робочими, але мають різну собівартість, затрати часу на виконання та різні типи приладів – як сучасні кПЛР термоциклери з режимом у реальному часі, так і більш дешеві ампліфікатори для простої ПЛР.

З усіх представлених тестів найбільш перспективний у плані собівартості, часу виконання та приладів є Тест 3б – з прямою детекцією вірусу без виділення РНК, синтезом кДНК з ізотермічним ферментом BstIII, ПЛР з хроматографічною детекцією (Рис. 58).

Особливу увагу звертають на себе комбіновані тест-системи. Вони дозволяють одночасно детектувати усі досліджувані патогени та змінювати їх кількість при необхідності.

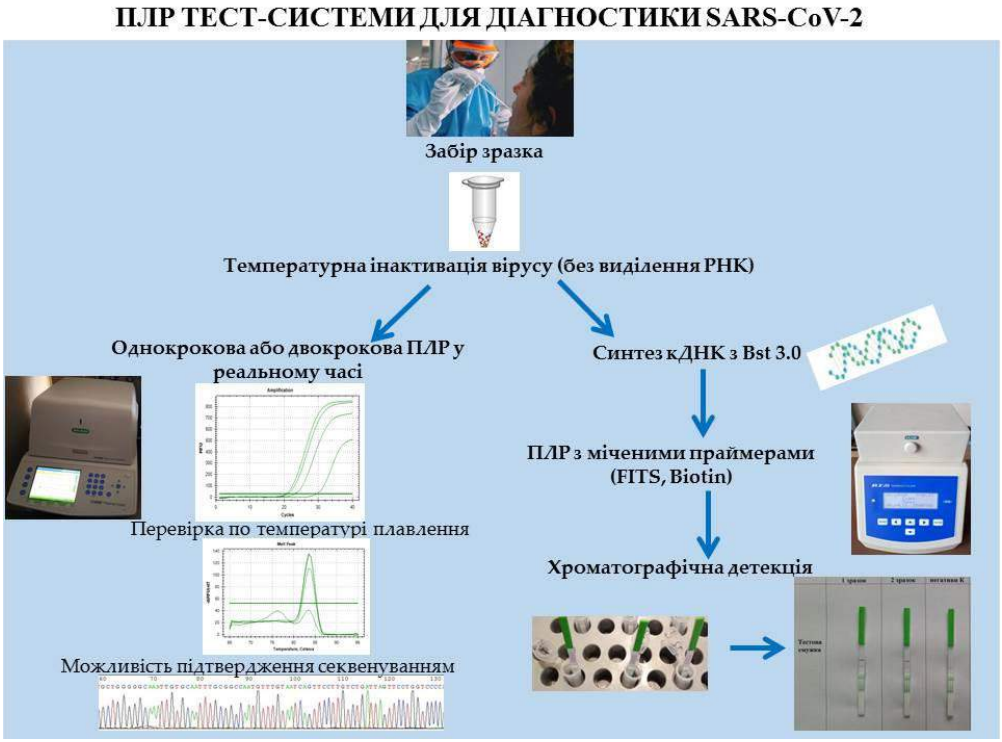


Рисунок 58. Схема тестів для детекції SARS-CoV-2 без виділення РНК.

9.2. Розробка протоколів для проведення детекції вірусу SARS-CoV-2 та комбінованих тестів для визначення вірусних патогенів.

Для проведення аналізів на детекцію вірусу SARS-CoV-2 використовуються зішкріби у транспортному середовищі.

Для тестів з двокроковою ПЛР: Тест 1 (з використанням кПЛР на основі інтеркалюючого флуоресцентного барвника), Тест 4 (ПЛР з хроматографічною детекцією) Тест 5 та Тест 6 необхідно виділення тотальної РНК стандартними методами та синтез кДНК стандартним методом. Для самого тесту використовуються 1-2 мкл готової кДНК.

Тести 1, 5, 6. Склад реакційної суміші і умови проведення кПЛР:

1. 4 мкл 5х суміші для кількісної ПЛР з інтеркалюючим флуоресцентним барвником (5×HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus)
2. Праймери (прямий та зворотній) – 0,5 мкл (10 мкМоль)
3. кДНК – 1-2 мкл
4. Вода (DNase, RNase free) – до 20 мкл

Ампліфікація проводиться за наступними параметрами:

Умови ампліфікації для кількісного ПЛР		
Температура, °С	**Час**	**Кількість циклів**
95	15 хв	1
95	15 сек	40
64	15 сек	
72	25 сек	
Плавлення продуктів кПЛР (від 65 до 95)	0,5 сек	1

По закінченню програми кПЛР перевіряються графіки ампліфікації та криві плавлення продуктів. Для цього типу тестів використовується ампліфікатор із детектором у реальному часі (Рис. 59)

Рисунок 59. Зображення приладу Thermal Cycler CFX96 Real-Time system для проведення кількісної ПЛР у режимі реального часу.

Тест 4. Склад реакційної суміші і умови проведення ПЛР:

1. 4 мкл 5х суміші для ПЛР без інтеркалюючого барвника (наприклад 5× HOT FIREPol Probe qPCR Mix Plus)
2. Праймери мічені FITC або DIG та біотином (прямий та зворотній) – 0,5 мкл (10 мкМоль)
3. кДНК – 1-2 мкл
4. Вода (DNase, RNase free) – до 20 мкл

Ампліфікація проводиться за наступними параметрами:

Умови ампліфікації для ПЛР		
Температура, °С	**Час**	**Кількість циклів**
95	15 хв	1
95	15 сек	35
64	15 сек	
72	25 сек	

Для цього типу тестів використовуються звичайні ПЛР ампліфікатори (Рис. 60)

Рисунок 60. Зображення приладу BIS Thermocycler для проведення ПЛР реакцій.

По закінченню ПЛР проводиться хроматографічна детекція:

1. 5 мкл ПЛР продукту
2. 100 мкл NALF буферу

Перемішати та нанести на хроматографічну смужку.

Для тестів з прямою детекцією (без виділення РНК): **Тест 2** (однокрокової кПЛР на основі інтеркалюючого флуоресцентного барвника) та **Тест 3** (двокроковий кПЛР з використанням ізотермічної полімерази BstIII у якості ревертази та кПЛР з інтеркалюючим флуоресцентним барвником (або ПЛР хроматографічною детекцією) необхідно взяти 20 мкл зразка у транспортому

середовищі, прогріваємо при 65 °С - 15 хв та 95°С – 5 хв та охолоджуємо на льоду. Зразок використовуємо для подальшого аналізу.

Склад реакційної суміші і умови проведення кПЛР (Тест 2):

1. 4 мкл 5х суміші для одноктокової кПЛР з інтеркалюючим барвником (наприклад SOLIScript 1-step SolisGreen Kit)
2. Праймери (прямий та зворотній) –0,5 мкл (10 мкМоль)
3. РНК – 2-3 мкл
4. Вода (DNase, RNase free) – до 20 мкл

Ампліфікація проводиться за наступними параметрами:

Умови ампліфікації для однокрокової кПЛР		
Температура, °С	**Час**	**Кількість циклів**
55	20 хв	1
95	12 хв	1
95	15 сек	40
64	15 сек	
72	25 сек	
Плавлення продуктів кПЛР (від 65 до 95)	0,5 сек	1

По закінченню програми кПЛР перевіряються графіки ампліфікації та криві плавлення продуктів. Для цього типу тестів використовується ампліфікатор із детектором у реальному часі (Рис. 59)

Для Тесту 3 (двокроковий кПЛР з використанням ізотермічної полімерази BstIII у якості ревертази та кПЛР з інтеркалюючим флуоресцентним барвником (або ПЛР хроматографічною детекцією) синтезується кДНК:

1. 10х буфер – 2 мкл
2. Праймер (зворотній) – 0,5 мкл (10 мкМоль)
3. BstIII – 1 мкл
4. Вода – до 20 мкл

Синтез кДНК проводили при температурі 55-60 **°С** 10 хв.

Склад реакційної суміші і умови проведення ПЛР «в реальному часі»:

1. 4 мкл 5х суміші для кількісної ПЛР з інтеркалюючим флуоресцентним барвником (5×HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus)

2. Праймери (прямий та зворотній) – 0,5 мкл (10 мкМоль)

3. кДНК (з BstIII) – 1-2 мкл

4. Вода (DNase, RNase free) – до 20 мкл

Ампліфікація проводиться за наступними параметрами:

Умови ампліфікації для кількісного ПЛР		
Температура, °С	**Час**	**Кількість циклів**
95	15 хв	1
95	15 сек	40
64	15 сек	
72	25 сек	
Плавлення продуктів кПЛР (від 65 до 95)	0,5 сек	1

По закінченню програми кПЛР перевіряються графіки ампліфікації та криві плавлення продуктів. Для цього типу тестів використовується ампліфікатор із детектором у реальному часі (Рис. 59)

У випадку використання ПЛР суміші без інтеркалюючого барвника використовуємо звичайну ПЛР суміш та хроматографічну детекцію:

Склад реакційної суміші і умови проведення ПЛР:

1. 4 мкл 5х суміші для ПЛР без інтеркалюючого барвника (наприклад 5× HOT FIREPol Probe qPCR Mix Plus)

2. Праймери мічені FITC або DIG та біотином (прямий та зворотній) – 0,5 мкл (10 мкМоль)

3. кДНК (з BstIII) – 1-2 мкл

4. Вода (DNase, RNase free) – до 20 мкл

Ампліфікація проводиться за наступними параметрами:

Умови ампліфікації для ПЛР		
Температура, °С	**Час**	**Кількість циклів**
95	15 хв	1
95	15 сек	35
64	15 сек	
72	25 сек	

Для цього типу тестів використовуються звичайні ПЛР ампліфікатори (Рис. 60)

По закінченню ПЛР проводиться хроматографічна детекція:

1. 5 мкл ПЛР продукту
2. 100 мкл NALF буферу

Перемішати та нанести на хроматографічну смужку.

Для цього типу тестів використовуються звичайні ПЛР ампліфікатори (Рис. 57)

9.3. Розробка протоколів для проведення аналізу експресії генів за допомогою комбінованої експресійної тест-системи

Тест 7. Комбінована експресійна панель генів вродженого імунітету та системи згортання крові.

На першому етапі потрібно отримати результати дослідження експресії генів, які пристрій для ПЛР в режимі реального часу (Thermal Cycler CFX96 Real-Time system) автоматично обчислює і відображає кількість копій мРНК на екрані у вигляді XX.XX ΔCt.

Потім необхідно провести нормалізацію розрахунків відносної експресії досліджених генів за моделями 2-ΔCt.

В наступному потрібно створити програму, яка буде містити прописані параметри та діапазони змін експресії відібраних генів, які характеризують нормальні та імунопатологічні стани у здорових і пацієнтів з COVID-19.

На наступному етапі необхідно порівняти відносний рівень експресії відібраних генів у зразках крові підозрюваних пацієнтів на імунопатологію COVID-19 із змінами експресії відібраних генів, які характеризують нормальні та імунопатологічні стани у пацієнтів з COVID-19 (гіперкоагуляцію, гіперзапалення або лімфопенія).

Результати інтерпретації тестування реєструють у Журналі протоколів проведення досліджень на ранню діагностику SARS-CoV-2-індукованої

імунопатології експрес тест-системою.

Кількісний аналіз експресії генів-біомаркерів імунопатології COVID-19 не повинен використовуватись як однозначний доказ для діагностики порушень викликаних COVID-19. Отримані результати повинні інтерпретуватися лікарем разом з клінічними даними та іншими результатами лабораторних досліджень.

ВИСНОВКИ

У результаті проведеної роботи проаналізована нуклеотидна послідовность геномів низки поширених штамів вірусу SARS-CoV-2, грипу та інших особливо небезпечних вірусних інфекцій (ОНВІ). Проведено біоінформативний аналіз вивчених геномів вірусів та дизайн праймерів для створення тест-систем на основі кПЛР реакцій та комбінованих тест-систем для визначення вірусних патогенів та експресії генів вродженого імунітету та згортання крові. Проведено підбір, синтез та очистку специфічних олігонуклеотидів для ПЛР аналізу патогенних вірусів та експресії низки генів імунної системи людини для дослідження, створення та відпрацювання комбінованих тест-систем. Було проведено збір біологічних рідин здорових та інфекційних хворих та створено колекцій РНК та кДНК.

Відпрацьовано методики отримання РНК зі зішкрібав для прямої детекції експресії генів для кПЛР методу та з використанням ізотермічної полімерази Bst3.0. Клоновано, експресовано в клітинах бактерій та напрацьовано рекомбінантний фермент Bst ДНК-полімерази для створення експрес тест-системи на основі ізотермічної ПЛР.

У результаті проведеної роботи учасниками проєкту проведено відпрацювання умов та складу реакційних сумішей для постановки різних варіантів кПЛР для визначення SARS-CoV-2 у біологічних рідинах на основі одиничних аналізів та комбінованих тест-систем. Відпрацьовано низку варіантів тестів для визначення вірусу SARS-CoV-2 та інших респіраторних вірусів на основі ПЛР та кПЛР для отримання комбінованих тест-систем. Доведено високу ефективність та специфічність запропонованих тестів на вибірках зразків.

Відпрацьовані умови та поставлено метод секвенування нового покоління для повногеномного генотипування вірусу SARS-CoV-2 у хворих на COVID-19 в Україні. Створено колекцію РНК зі зішкрібів хворих на COVID-19 для проведення повногеномного генотипування вірусу SARS-CoV-2. Вперше в Україні за допомогою повногеномного генотипуваня виявлено два нові небезпечні варіанти вірусу SARS-CoV-2 - Альфа варіант (B.1.1.7) – у лютому

2021 року та Дельта варіант (B.1.617.2) – у червні 2021 року. Обидва випадки допомогли своєчасно інформувати український уряд, МОЗ та суспільство задля своєчасного адекватного реагування та проведення протиепідемічних заходів. Загалом проаналізовано 234 зразки РНК вірусу SARS-CoV-2, виділеного з назофарингеального епітелію хворих на COVID-19 з 20 регіонів України.

Проведено добір зразків та створено колекції РНК зі зразків крові здоворих донорів та хворих на COVID-19, створено колекцію РНК зі зішкрібав хворих на COVID-19 для проведення повногеномного генотипування вірусу SARS-CoV-2.

Відпрацьовано умови проведення кПЛР аналізу та встановлено рівні відносної експресії десяти генів вродженого імунітету 59 здорових донорів та 52 хворих на гостру форму COVID-19 для створення комбінованої експресійної тест-системи, зокрема *MX1, OAS1, RNASEL, EIE2AK2, IL8, IL6, TNFα, IL10, CD4, F5.* Для 8 з них знайдено значущі різниці рівнів відносної експресії між контрольною групою та хворими на COVID-19. Завдяки проведеному статистичному та біоінформатичному аналізу запропоновано експресійні набори біомаркерів з 3-8 генів, які дозволяють діагностування гіперзапалення, гіперкоагуляцію та лімфопенію у периферичних клітинах крові пацієнтів з COVID-19 з високими показниками чутливості, специфічності та точності для розробки комбінованої експресійної тест-системи. Найвищі показники чутливості, специфічності та точності виявлено для комбінації трьох експресійних біомаркерів: *F5, MX1, CD4* (Ac.0,9; Se.0,92; Sp.0,88), тоді як найвищий показник прогностичної цінності набору біомаркерів (OR) має комбінація з 6-и генів: *F5, MX1, RNASEL, CD4, IL10, EIF2AK2* (OR=134,37).

Для запропонованих ПЛР тестів для визначення вірусу SARS-CoV-2 та експресійної системи розроблено протоколи для проведення аналізів.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. David de Paz, H., Brotons, P and Mun oz-Almagro, C. Molecular isothermal techniques for combating infectious diseases: towards low-cost point-of-care diagnostics// Expert Rev. Mol. Diagn. 2014, 14 (7), 827–843.

2. Lu, R., Wu,X., Wan, Z., Li, Y., Jin, X. and Zhang, C. A Novel Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of SARS-CoV-2 // Int.J.Mol.Sci 2020, 21, 2826. doi:10.3390/ijms21082826.

3. Cuadrado-Payán, E., Montagud-Marrahi, E.,Torres-Elorza, M., Bodro, M., Blasco, M. Poch, E., Soriano A., Pineiro, G.J. //SARS-CoV-2 and influenza virus co-infection// Lancent, 2020, 395(10236):e84. doi: 10.1016/s0140-6736(20)31052-7.

4. Goeijenbier, M. , van Wissen, M., van de Weg, C., Jong, E., Gerdes, V. E. A., Meijers, J, C, M., Brandjes, D. P. M., van Gorp, E. C. M. Viral Infections and Mechanisms of Thrombosis and Bleeding // J Med Virol . 2012, 84 (10):1680-96. doi: 10.1002/jmv.23354.

5. Riera Romo M, Pérez-Martínez D, Castillo Ferrer C. Innate immunity in vertebrates: an overview. Immunology. 2016, 148 (2):125-39.

6. Thaiss C.A, Zmora N, Levy M, Elinav E. The microbiome and innate immunity. Nature. 2016, 535 (7610):65-74.

7. Jinushi M. The role of innate immune signals in antitumor immunity. Oncoimmunology. 2012, 1 (2):189-194.

8. Berraondo P, Minute L, Ajona D, Corrales L, Melero I, Pio R. Innate immune mediators in cancer: between defense and resistance. Immunol Rev. 2016, 274 (1):290-306.

9. Prat A, Navarro A, Paré L, Reguart N, Galván P, Pascual T, Martínez A, Nuciforo P, Comerma L, Alos L, Pardo N, Cedrés S, Fan C, Parker JS, Gaba L, Victoria I, Viñolas N, Vivancos A, Arance A, Felip E. Immune-Related Gene Expression Profiling After PD-1 Blockade in Non-Small Cell Lung Carcinoma, Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, and Melanoma. Cancer Res. 2017, 77(13):3540-3550.

10. Riera Romo M, Pérez-Martínez D, Castillo Ferrer C. Innate immunity in vertebrates: an overview. Immunology. 2016, 148 (2):125-39.

11. Thaiss C.A, Zmora N, Levy M, Elinav E. The microbiome and innate immunity. Nature. 2016, 535 (7610):65-74.
12. Jinushi M. The role of innate immune signals in antitumor immunity. Oncoimmunology. 2012, 1 (2):189-194.
13. Berraondo P, Minute L, Ajona D, Corrales L, Melero I, Pio R. Innate immune mediators in cancer: between defense and resistance. Immunol Rev. 2016, 274 (1):290-306.
14. Prat A, Navarro A, Paré L, Reguart N, Galván P, Pascual T, Martínez A, Nuciforo P, Comerma L, Alos L, Pardo N, Cedrés S, Fan C, Parker JS, Gaba L, Victoria I, Viñolas N, Vivancos A, Arance A, Felip E. Immune-Related Gene Expression Profiling After PD-1 Blockade in Non-Small Cell Lung Carcinoma, Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, and Melanoma. Cancer Res. 2017, 77(13):3540-3550.
15. O'Connell G.C, Treadway M.B, Petrone A.B., Tennant C.S., Lucke-Wold N., Chantler P.D., Barr T.L. Leukocyte Dynamics Influence Reference Gene Stability in Whole Blood: Data-Driven qRT-PCR Normalization Is a Robust Alternative for Measurement of Transcriptional Biomarkers. Lab Med. 2017 Nov 8;48(4):346-356.
16. Romani C, Calza S, Todeschini P, Tassi RA, Zanotti L, Bandiera E, Sartori E, Pecorelli S, Ravaggi A, Santin AD, Bignotti E. Identification of optimal reference genes for gene expression normalization in a wide cohort of endometrioid endometrial carcinoma tissues. PLoS One. 2014 Dec 4;9(12):e113781.
17. Liu Y, Liu J., Plante K.S., Plante J.A., Xie X., et al. The N501Y spike substitution enhances SARS-CoV-2 transmission. – *bioRxiv*, 2021; doi: https://doi.org/10.1101/2021.03.08.434499.
18. Kashuba V. I., Hryshchenko N. V., Gerashchenko G. V., Melnichuk N. S., Marchishak T. V., Chernushyn S. Yu., Chernenko L. M., Liashko V. K., Tkachuk Z. Yu., Tukalo M. A. Identification and characterization of the SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 upon the new outbreak of the COVID-19 in Ukraine in February 2021. - Biopolym. Cell. 2021; 37(2):117-124. http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A52
19. Москалюк ВД, Сидорчук АС. Діагностика та лікування грипу:сучасні клініко-патогенетичні аспекти. Інфекційні хвороби. 2016; 2(84): 1–14.

20. Riera Romo M, Pérez-Martínez D, Castillo Ferrer C. Innate immunity in vertebrates: an overview. Immunology. 2016, 148(2):125-39.
21. Thaiss C.A, Zmora N, Levy M, Elinav E. The microbiome and innate immunity. Nature. 2016, 535(7610):65-74.
22. Jinushi M. The role of innate immune signals in antitumor immunity. Oncoimmunology. 2012, 1(2):189-194.
23. Berraondo P, Minute L, Ajona D, Corrales L, Melero I, Pio R. Innate immune mediators in cancer: between defense and resistance. Immunol Rev. 2016, 274(1):290-306.
24. Prat A, Navarro A, Paré L, Reguart N, Galván P, Pascual T, Martínez A, Nuciforo P, Comerma L, Alos L, Pardo N, Cedrés S, Fan C, Parker JS, Gaba L, Victoria I, Viñolas N, Vivancos A, Arance A, Felip E. Immune-Related Gene Expression Profiling After PD-1 Blockade in Non-Small Cell Lung Carcinoma, Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, and Melanoma. Cancer Res. 2017, 77(13):3540-3550.
25. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Hryshchenko NV, Mevs LV, Nekrasov KA, Lytvynenko RA, Vitruk YV, Gryzodub OP, Stakhovsky EA, Kashuba VI. Expression of cancer-associated genes in prostate tumors. Exp Oncol. 2017, 39(2):131-137.
26. Melnichuk N., Kashuba V., Rybalko S., Tkachuk Z. Complexes of Oligoribonucleotides with d-Mannitol Modulate the Innate Immune Response to Influenza A Virus H1N1 (A/FM/1/47) In Vivo. Pharmaceuticals (Basel). 2018, 11(3), pii: E73.
27. Achiron A, Gurevich M, Friedman N, Kaminski N, Mandel M: Blood transcriptional signatures of multiple sclerosis: unique gene expression of disease activity. Ann Neurol 2004, 55:410-417.
28. Gladkevich A, Kauffman HF, Korf J: Lymphocytes as a neural probe: potential for studying psychiatric disorders. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2004, 28:559-576.
29. Tang Y, Nee AC, Lu A, Ran R, Sharp FR: Blood genomic expression profile for neuronal injury. J Cereb Blood Flow Metab 2003, 23:310-319.

30. Twine NC, Stover JA, Marshall B, Dukart G, Hidalgo M, Stadler W, Logan T, Dutcher J, Hudes G, Dorner AJ, Slonim DK, Trepicchio WL, Burczynski ME: Disease-associated expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from patients with advanced renal cell carcinoma. Cancer Res 2003, 63:6069-6075.
31. Han M, Liew CT, Zhang HW, Chao S, Zheng R, Yip KT, Song ZY, Li HM, Geng XP, Zhu LX, Lin JJ, Marshall KW, Liew CC: Novel blood-based, fivegene biomarker set for the detection of colorectal cancer. Clin Cancer Res 2008, 14:455-460.
32. Burczynski ME, Twine NC, Dukart G, Marshall B, Hidalgo M, Stadler WM, Logan T, Dutcher J, Hudes G, Trepicchio WL, Strahs A, Immermann F, Slonim DK, Dorner AJ: Transcriptional profiles in peripheral blood mononuclear cells prognostic of clinical outcomes in patients with advanced renal cell carcinoma. Clin Cancer Res. 2005, 11:1181-1189.
33. Peper RL, van Campen H. Tumor necrosis factor as a mediator of inflammation in iluenza A viral pneumonia. Microb Pathog. 1995; 19:175–183.
34. Biron CA. Initial and innate responses to viral infections –pattern setting in immunity or disease. Curr Opin Microbiol. 1999; 2:374–381.
35. Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. J Immunol. 2005; 175:3463–3468.
36. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell. 2006;124:783–801.
37. Schoggins JW. Interferon-stimulated genes: roles in viral pathogenesis. Curr Opin Virol. 2014;6:40–46.
38. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. Annu Rev Immunol. 2014; 32:513–545.
39. GeurtsvanKessel CH, Willart MA, van Rijt LS, et al. Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+CD11 b- but not plasmacytoid dendritic cells. J Exp Med. 2008; 205: 1621–1634.
40. Kim TS, Braciale TJ. Respiratory dendritic cell subsets differ in their capacity to support the induction of virus-specific cytotoxic CD8+ T cell responses. PLoS One. 2009; 4: e4204.

41. Herold S, Becker C, Ridge KM, Budinger GR. Influenza virus-induced lung injury: pathogenesis and implications for treatment. Eur Respir J. 2015 May;45(5):1463–78.
42. Merad, M., Martin, J.C. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. Nat Rev Immunol 20, 355–362 (2020). https://doi.org/10.1038/s41577-020-0331-4
43. Lüke F, Orsó E, Kirsten J, et al. Coronavirus disease 2019 induces multi-lineage, morphologic changes in peripheral blood. EJHaem. 2020;10.1002/jha2.44. doi:10.1002/jha2.44
44. Achiron A, Gurevich M, Friedman N, Kaminski N, Mandel M: Blood transcriptional signatures of multiple sclerosis: unique gene expression of disease activity. Ann Neurol 2004, 55:410-417.
45. Gladkevich A, Kauffman HF, Korf J: Lymphocytes as a neural probe: potential for studying psychiatric disorders. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2004, 28:559-576.
46. Tang Y, Nee AC, Lu A, Ran R, Sharp FR: Blood genomic expression profile for neuronal injury. J Cereb Blood Flow Metab 2003, 23:310-319.
47. Twine NC, Stover JA, Marshall B, Dukart G, Hidalgo M, Stadler W, Logan T, Dutcher J, Hudes G, Dorner AJ, Slonim DK, Trepicchio WL, Burczynski ME: Disease-associated expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from patients with advanced renal cell carcinoma. Cancer Res 2003, 63:6069-6075.
48. Han M, Liew CT, Zhang HW, Chao S, Zheng R, Yip KT, Song ZY, Li HM, Geng XP, Zhu LX, Lin JJ, Marshall KW, Liew CC: Novel blood-based, fivegene biomarker set for the detection of colorectal cancer. Clin Cancer Res 2008, 14:455-460.
49. Burczynski ME, Twine NC, Dukart G, Marshall B, Hidalgo M, Stadler WM, Logan T, Dutcher J, Hudes G, Trepicchio WL, Strahs A, Immermann F, Slonim DK, Dorner AJ: Transcriptional profiles in peripheral blood mononuclear cells prognostic of clinical outcomes in patients with advanced renal cell carcinoma. Clin Cancer Res 2005, 11:1181-1189.
50. RB D'Agostino, "Tests for Normal Distribution" in Goodness-Of-Fit Techniques edited by RB D'Agostino and MA Stepenes, Macel Decker, 1986.

51. Kawai T, Akira S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. Immunity. 2011: 34:637–650.
52. Villalon-Letelier F, Brooks AG, Saunders PM, Londrigan SL, Reading PC. Host cell restriction factors that limit influenza A infection. Viruses. 2017; 9:376.
53. Blanco-Melo, D. et al. Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19. Cell 181, 1036–1045 (2020).
54. Kim TS, Braciale TJ. Respiratory dendritic cell subsets differ in their capacity to support the induction of virus-specific cytotoxic CD8+ T cell responses. PLoS One. 2009; 4: e4204.
55. Huang C, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet. 2020;395:497–506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
56. Giamarellos-Bourboulis EJ, et al. Complex immune dysregulation in COVID-19 patients with severe respiratory failure. Cell Host Microbe. 2020;27:992–1000.
57.Tan L, et al. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. Signal. Transduct. Target. Ther. 2020;5:33.
58. Kuri-Cervantes L, et al. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. Sci. Immunol. 2020;5:eabd7114.
59. Mathew D, et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. Science. 2020 doi: 10.1126/science.abc8511.
60. Mazzoni A, et al. Impaired immune cell cytotoxicity in severe COVID-19 is IL-6 dependent. J. Clin. Invest. 2020 doi: 10.1172/JCI138554.
61. Taga K, Tosato G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. J. Immunol. 1992;148:1143–1148.
62. Böttcher JP, et al. IL-6 trans-signaling-dependent rapid development of cytotoxic CD8+ T cell function. Cell Rep. 2014;8:1318–1327.
63. Malefyt R, et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. J. Exp. Med. 1991;174:915–924.

64. Liu Y, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an independent risk factor for mortality in hospitalized patients with COVID-19. J. Infect. 2020;81:e6–e12.
65. Mahmoud B. Malas1, *, Isaac N. Naazie1 , Nadin Elsayed, Asma Mathlouthi, Rebecca Marmor, Bryan Clary. Thromboembolism risk of COVID-19 is high and associated with a higher risk of mortality: A systematic review and meta-analysis. EClinical Medicine 2930 (2020) 100639. https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100639
66. Tang N, et al. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. J Thromb Haemost. 2020;18: 844-847.
67. Rouhezamin MR, Haseli S. Diagnosing Pulmonary Thromboembolism in COVID-19: A Stepwise Clinical and Imaging Approach. Acad Radiol. 2020 Jun;27(6):896-897. doi: 10.1016/j.acra.2020.04.023. Epub 2020 Apr 17. PMID: 32331965; PMCID: PMC7164893.
68. Bikdeli B, Madhavan MV, Jimenez D, Chuich T, Dreyfus I, Driggin E, et al. COVID-19 and thrombotic or thromboembolic disease: implications for prevention, antithrombotic therapy, and follow-up. J Am Coll Cardiol. 2020;75(2950):2973.
69. Motsinger AA, Ritchie MD. Multifactor dimensionality reduction: an analysis strategy for modelling and detecting gene-gene interactions in human genetics and pharmacogenomics studies. Hum Genomics. 2006 Mar;2(5):318-28. doi: 10.1186/1479-7364-2-5-318. PMID: 16595076; PMCID: PMC3500181.
70. Gerashchenko GV, Rynditch AV, Kashuba VI. Development of gene expression panels to determine prostate cancer. Dopov. Nac. acad. Nauk Ukr. 2019; (1):100-6.
71. Ray P, Le Manach Y, Riou B, Houle TT. Statistical evaluation of a biomarker. Anesthesiology. 2010 Apr;112 (4):1023-40.
72. Lüke, Florian et al. “Coronavirus disease 2019 induces multi-lineage, morphologic changes in peripheral blood cells.” EJHaem, 10.1002/jha2.44. 29 Jun. 2020, doi:10.1002/jha2.44

Viruses and Cell

ISSN 1993-6842 (on-line); ISSN 0233-7657 (print)
Biopolymers and Cell. 2021. Vol. 37. N 2. P 117–124
doi: http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A52

UDC 578.2:579.25+578.834:616.24-002

Identification and characterization of the SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 upon the new outbreak of the COVID-19 in Ukraine in February 2021

V. I. Kashuba[1], N. V. Hryshchenko[1], G. V. Gerashchenko[1], N. S. Melnichuk[1], T. V. Marchishak[1], S. Yu. Chernushyn[1], L. M. Chernenko[2], V. K. Liashko[3], Z. Yu. Tkachuk[1], M. A. Tukalo[1]

[1] Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150, Akademika Zabolotnoho Str., Kyiv, Ukraine, 03143

[2] State Enterprise Center of Public Health of the Ministry of Health of Ukraine,
41, Yaroslavska, Kyiv, Ukraine, 04071

[3] The Ministry of Health of Ukraine
7, Hrushevskoho, Kyiv, Ukraine, 01601
g.v.gerashchenko@imbg.org.ua

Aim. To identify and characterize the SARS-CoV-2 variants, collected upon the new wave of COVID-19 outbreak in Ivano-Frankivs'k region of Ukraine, using the whole genome genotyping. **Methods.** The parallel whole genome sequencing was performed on the processed RNA, isolated from nasopharyngeal swabs of 19 patients, using an Ion GeneStudio S5 Plus System. **Results.** All the identified SARS-CoV-2 genotypes were referred to 20I/501Y.V1 clade, the variant VUI202012/01 GRY (the B.1.1.7 lineage). In the analyzed virus variants forty-seven various mutations were found. Besides the founder 20I/501Y.V1 missense mutations, several unique alterations were detected, including those in the S- and N-proteins of SARS-CoV-2, that might have clinical and epidemiological relevance. **Conclusions.** The current wave of the COVID-19 outbreak in Ukraine is associated not only with seasonal fluctuations in the virus transmission, but also with the emergence of more aggressive virulent variants, such as B.1.1.7, which basically displaced previous strains and affects the younger population.

K e y w o r d s: SARS-CoV-2, whole genome genotyping, mutations

Introduction

The coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic is one of the most imperative problems in the world for now. A virus, causing this disease, the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) quite quickly became more virulent and aggressive in the human population [1, 2]. These features could be explained by the fact that SARS-

© 2021 V. I. Kashuba *et al.*; Published by the Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine on behalf of Biopolymers and Cell. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited

CoV-2, being a positive-sense single stranded RNA virus, demonstrates a high level of genome plasticity in the absence of the effective mechanisms for correcting replication errors. In other words, the sudden outbreak of the COVID-19 pandemic is caused mainly by mutated variants of SARS-CoV-2. The novel mutations, most probably, resulted in more aggressive clinical manifestation of COVID-19, affecting groups of people that have not been previously at high risk, such as young people and children [3]. Additionally, the emergence of new SARS-CoV-2 variants requires the correction of both, protocols of patient treatment and assessment of the effectiveness of antiviral drugs and vaccines [4, 5].

Since the beginning of the pandemic, strategies for the monitoring of mutations in SARS-CoV-2 were actively developed around the world, to respond in a timely manner to the emergence o new strains. These strategies include optimization of the regular partial (Sanger) or whole genome (NGS, Nanopore, *etc.*) sequencing to detect variants of the virus in various groups of patients and mass-targeted testing (PCR, ELISA, *etc.*) of the population for the known dangerous SARS-CoV-2 mutations. Ukraine, being one of the largest countries in Central Europe with high population mobility, is at the high epidemiological risk of the COVID-19 pandemic. By mid-October 2020, a "British strain" (the B.1.1.7 lineage), that caused the third wave of the COVID-19 outbreak in Europe, was dominant in neighboring countries.

The aim of the present study was to identify and characterize the SARS-CoV-2 variants, obtained from Ivano-Frankivs'k region of Ukraine upon the new February 2021 wave of the COVID-19 outbreak, using whole genome genotyping.

Material and Methods

Patient samples. Nasopharyngeal swabs were collected on February 22, 2021 from 17 patients in seven districts of Ivavo-Frankivs'k region and two samples in Kyiv by the Center for Public Health of the Ministry of Health of Ukraine. Sampling was conducted in accordance with the Helsinki declaration and approved by the Ministry of Health of Ukraine in agreement with the Center for Public Health. IMBG Ethical Approval № 2/23.03.2021. All patients were hospitalized with acute respiratory symptoms and were positive for SARS-CoV-2 by a specific qPCR test. The study group was created of randomly selected 17 samples from Ivavo-Frankivs'k region (8 females and 9 males; 8 patients were younger than 60 years old) and 2 samples from Kyiv region (age and gender are unknown).

Isolation of the total RNA was performed, using a Virus DNA/RNA isolation kit (ZymoResearch, USA), according to the manufacturer protocol. cDNA synthesis was carried out with the use of SuperScript IV VILO Master Mix (INVITROGEN, USA). The targeted libraries for sequencing were prepared with the help of the SARS-CoV-2 specific primers pools 1 and 2 from an Ion AmpliSeq SARS-CoV-2 Research Panel (Thermo Fisher Scientific, USA), barcoded with an Ion Xpress™ Barcode Adapters Kit and an Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, USA), following the user guide recommendations. The final concentration of barcoded libraries was determined, using Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit (Thermo

Fisher Scientific, USA). Barcoded libraries were diluted and pooled equimolarly (140–150 pM of each library). Emulsion PCR was performed on One Touch 2 machine (Thermo Fisher Scientific, USA), followed by enrichment and loading onto the Ion S5 530 chip. NGS was performed on Ion GeneStudio S5 Plus System, according to the manufacturer protocols. Bioinformatic and statistical analyses were conducted by a Torrent Suite Software, using the SARS-CoV-2 Research Plug-in Package v1.3.0 (Thermo Fisher Scientific, USA). To assemble the SARS-CoV-2 genome, a reference-based IRMA plugin report was used. Additional analysis of mutations of nucleotides and amino acids, phylogeny and genomic epidemiology were performed, using GISAID (www.gisaid.org) and Nextstrain SARS-CoV-2 resources.

Results and Discussion

The obtained results of next generation sequencing of 19 samples, followed by the GISAID analysis of the SARS-CoV-2 whole genome, revealed that all analyzed samples contained the "British variant" of the virus, VUI202012/01 GRY (the B.1.1.7 lineage, 20I/501Y.V1 clade).

Noteworthy, 47 different missense mutations were identified in the 19 sequenced genomes of SARS-CoV-2, in comparison with the hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019 variant. Besides the founder 20I/501Y.V1 (EPI_ISL_581117) mutations, several other unique alterations were detected, including those in the S- and N-proteins, that may be of clinical and epidemiological importance. The mutations, common with the B.1.1.7 variants, and individual unique mutations are shown in Table 1 in comparison with the reference Wuhan coronavirus genome.

The most clinically relevant alteration in the studied Ukrainian variants of the SARS-CoV-2 genome is the N501Y mutation in the Spike protein. At first, it was detected in Great Britain more than one year ago [WHO. WHO SARS-CoV-2 variant — United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland. https://www.who.int/csr/don/21-december-2020-sars-cov2-variantunited-kingdom/en (accessed Dec 22, 2020)]. This mutation is associated with an increased spread of transmission and high contagiousness all over the world, affecting the younger population more, than the previous virus variants [6]. All the virus genomes of Ukrainian patients contained the missense founder mutations in the Spike and N proteins, common for the B.1.1.7 variants. According to the GISAID data, the earliest full genome sequence of the B.1.1.7 with a high coverage was detected in United Kingdom (ID: EPI_ISL_581117). This sequence contains all founder B.1.1.7 missense mutations and has one unique substitution in the NSP9 protein (Table 1). Of note, the EPI_ISL_581117 genome does not contain yet the nonsense NS8_K68stop mutation, as well as 9 of Ukrainian genomes. This mutation was found later in sequences of the B.1.1.7 lineage.

We have to mention, that in British variant and in 10 of Ukrainian samples there is an earlier mutation G204R, in the 204 residue of the N-protein. It seems that these genotypes appeared earlier; hence, various minor mutations could now be detected, such as P822L, P153S, S1670F in NSP3; L75F in NSP5; A225V in NSP14; T307I and P621S in the Spike protein and E106stop in NS8. Thus,

NS8_K68stop is one of the later founder mutations. Importantly, all Ukrainian virus genomes, that contained this mutation, had also the G204P mutation in the N-protein. In the GISAID database, 2 out of 55 Ukrainian virus sequences with the K68stop mutation in the NS8 protein also contained the G204R mutation, that indicates their earlier origin compared to the Ukrainian samples with a combination of mutations NS8_K68stop and N_G204P. Hence, Ukrainian SARS-Cov-2 genomes of the B.1.1.7 lineage could be divided in two groups by the time of origin: "older" genotypes (10 samples out of 19 with the N_G204R mutation) and "younger" ones (9 remaining samples). In "younger" genomes an additional set of the minor mutations was detected (Table 1).

The results of the comparative phylogenetic analysis are presented in Figure 1. All samples in the B.1.1.7 lineage contain more than 30 mutations in a single virus genome.

For a more accurate analysis of the origin of the detected virus genome variants, the phylogenetic analysis was carried out, using the Nextstrain resource. The following reference samples from GISAID database were used:

1. Accession ID: **EPI_ISL_581117** (Founder of B1.1.7 lineage, Table 1);

Table 1. **The missense mutations in the B.1.1.7 and Ukrainian variants of the SARS-CoV-2 genome, in comparison with the reference genome hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019**

Sample number	GISAD ID	Patient data			SARS-CoV-2 proteins with aa changes											
		Gender	Age	NSP2	NSP3	NSP5	NSP6	NSP9	NSP12	NSP13	NSP14	Spike protein	NS3	NS7a	NS8	N protein
20I 501Y.V1 B.1.1.7 **	EPI_ISL_581117 ***				T183I, A 890D, I1 412T		S106del, G107del, F108del	D78N!	P323L			H69del, V70del, Y144del, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H			Q27stop, R52I, Y73C	D3L, R203K, G204R, S 235F
142627	EPI_ISL_1298474	F	Un	-	-	-	-	-	-	-	-	P621S	-	-	-	-
142706	EPI_ISL_1298480	M	70	-	-	-	-	-	-	-	A225V	-	-	-	-	-
142638	EPI_ISL_1298482	M	23	-	P822L	L75F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
142660	EPI_ISL_1298481	F	67	-	P153S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
142672	EPI_ISL_1298488	M	60	-	S1670F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
142701	EPI_ISL_1298484	M	45	-	-	-	-	-	-	-	-	T307I	-	-	-	-
142702	NA	M	45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
00008*	NA	Un	Un	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
142689	EPI_ISL_1298486	M	81	T634I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E106stop	-
142659	NA	F	45	gap	gap	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E106stop	-
142658	EPI_ISL_1298476	M	90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K68stop	G204P
142662	EPI_ISL_1298477	F	61	-	-	-	-	K84R	-	-	-	-	-	-	K68stop	G204P
142690	EPI_ISL_1298478	M	44	-	L72F	-	-	-	-	-	-	-	-	E16D	K68stop	G204P
142695	EPI_ISL_1298475	M	45		D226E	-	-	-	-	S74P	-	-	-	G38A	K68stop	G204P
142692	EPI_ISL_1298479	F	62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K68stop	G204P
142683	EPI_ISL_1298487	F	43	-	A861V	-	-	-	T912I	-	-	-	G172C	-	P30L, K68stop	G204P
142697	EPI_ISL_1298485	F	28	-	-	-	-	-	-	-	-	P807S	-	-	K68stop	G204P
142670	EPI_ISL_1298483	F	87	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K68stop	G204P
00010*	NA	Un	Un	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K68stop	G204P

Notes: UN — unknown; gap — lack of nucleotide sequence; * — Kyiv samples; ** — common mutations for Ukrainian samples and the B.1.1.7 lineage founder, *** — the founder B.1.1.7 genotype, collection date 2020-09-21; Originating lab: Lighthouse Lab in Milton Keynes; Submitting lab: Wellcome Sanger Institute for the COVID-19 Genomics UK (COG-UK) consortium; Authors: The Lighthouse Lab in Milton Keynes and Alex Alderton, Roberto Amato, Sonia Goncalves, Ewan Harrison, David K. Jackson, Ian Johnston, Dominic Kwiatkowski, Cordelia Langford, John Sillitoe on behalf of the Wellcome Sanger Institute COVID-19 Surveillance Team.

2. Accession ID: **EPI_ISL_741665** (Founder of genotypes with NS8_K68stop): collection date: 2020; location: UK/England; Originating lab: Centre for Enzyme Innovation, University of Portsmouth / Translational Research Laboratory, Portsmouth

Hospitals NHS Trust; Submitting lab: COVID-19 Genomics UK (COG-UK) Consortium; **Authors**: *A. Beckett, Y. Bourgeois, G. Scarlett, S. Glaysher, S. Elliott, K. Bicknell, R. Impey, A. Lloyd, S. Wyllie, E. Butcher, A. Chauhan, S. Robson*;

3. Accession ID: **EPI_ISL_1119202** (Founder of genotypes with NS8_K68stop+N_G204P):Collection date: 2020-11-09; location: Switzerland / Bern; Originating lab: Viollier AG; Submitting lab: Department of Biosystems Science and Engineering, ETH Zürich; **Authors**: *C. Chen, S. Nadeau, I. Topolsky, E. Dermitzakis, K. Harshman, I. Xenarios, H.i Pegeot, L. Cerutti, D. Penet, P. Jablonski, L. Fuhrmann, D. Dreifuss, K. Jahn, C. Beckmann, M. Redondo, O. Kobel, C. Noppen, S. Seidel, N. S. de Souza, N. Beerenwinkel, T. Stadler;*

4. Accession ID: **EPI_ISL_831663** (Close to Ukraine more recent genotype with NS8_K68stop+G204P): Collection date: 2021-01-12; location: Slovakia / Hurbanovo; Originating lab: Institute of Virology, Biomedical Research Center of the Slovak Academy of Sciences, Bratislava; Submitting lab: Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava; **Authors**: *K. Boršová, V. Čabanová, B. Brejová, V. Hodorová, S. F. Havlíková, J. Kopáček, M. Ličková, Ľ. Lukáčiková, M. Neboháčová, M. Sláviková, T. Vinař, B. Klempa, J. Nosek*;

5. Accession ID: **EPI_ISL_741706** (Founder of genotypes with NS8_E106stop): Collection date: 2020; location: UK / England; Originating lab: Centre for Enzyme Innovation, University of Portsmouth / Translational Research Laboratory, Portsmouth Hospitals NHS Trust; Submitting lab: COVID-19 Genomics UK (COG-UK) Consortium; **Authors**: *A. Beckett, Y. Bourgeois, G. Scarlett, S. Glaysher, S. Elliott, K. Bicknell, R. Impey, A. Lloyd, S. Wyllie, E. Butcher, A. Chauhan, S. Robson*;

The phylogenetic analysis showed that SARS-Cov-2 variants in the Ukrainian study group have different origin. They could be divided into two large clusters, with and without the combination of mutational NS8_K68stop and N_G204P. These clusters could be further sub-divided into smaller groups. In the genome cluster bearing the combination of NS8_K68stop and N_G204P mutations, three samples belong to two different brunches. Thus, the samples 142690 and 142692 have a common ancestor (142670). This fact supports our assumption that the B.1.1.7 variants were circulating in Ukraine long enough to evolve from the common "Ukrainian" ancestor.

In the second cluster, the sample 142689 forms a brunch with the reference variant EPI_ISL_741706. In both genomes there is the NS8_E106stop mutation, which is also present in the Ukrainian 142659 sample (this sequence was omitted from the phylogenetic analysis, due to several gaps in the NSP3 gene region). Importantly, this mutation (NS8_E106stop) was also present in the virus genome of the 595 B.1.1.7 lineage in GISAID, demonstrating the origin different from other B.1.1.7 variants.

Summarizing, we suggest that in the end of February 2021, the variants of the SARS-CoV-2 of the B.1.1.7 lineage, that are different by the origin and the time of occurrence, pre-

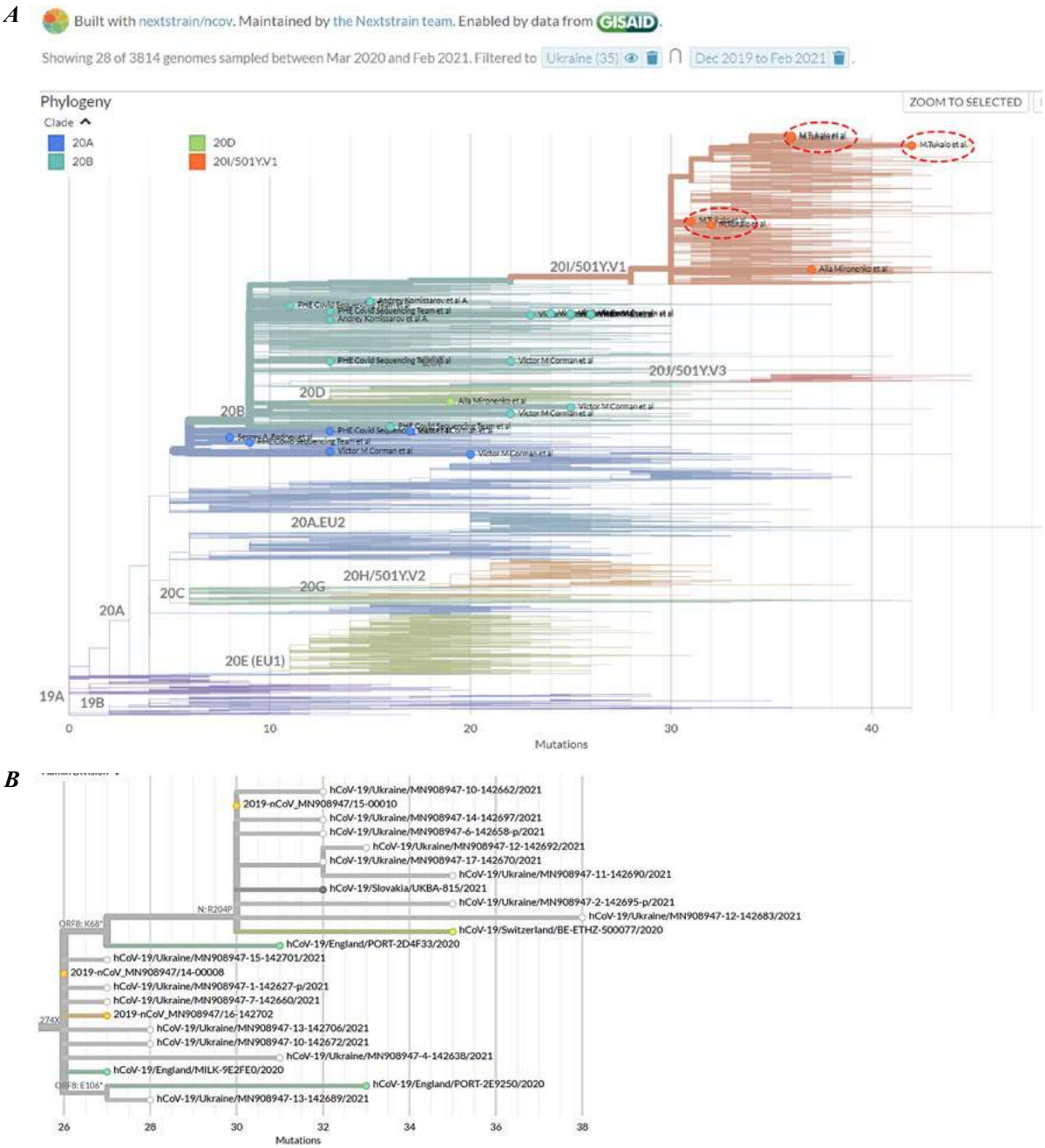


Fig. 1. *A* — Genomic epidemiology of SARS-Cov-2 in Europe – a European phylogenetic tree till the end of February (GISAID); the Ukrainian samples from current study are in ovals in red. *B* — A phylogenetic tree of the SARS-Cov-2 variants – global and current study focused subsampling: Ivano-Frankivs'k samples uploaded to GISAID are marked in light grey (current study); not uploaded to GISAID samples are marked in orange (current study); reference samples from GISAID are marked in other colors.

vailed in Ukraine, although they were identified in Ukraine only in March 2021. Additionally, we propose that the "British variants" of the SARS-CoV-2 did not enter Ukraine at one time, since they have the recurrent origin.

The data on the genome sequencing of SARS-CoV-2 variants have been uploaded to the GISAID database (www.gisaid.org).

Conclusions

We think that the current wave of the COVID-19 outbreak in Ukraine is associated not only with seasonal fluctuations in the virus transmission, but also with the emergence of more aggressive virulent types of the B.1.1.7 variant in our country, that have replaced previous strains and are affecting younger population.

Based on the above, we suggest that the introduction of regular monitoring of genomic epidemiology of SARS-Cov-2 in Ukraine will improve the effectiveness of the anti-epidemiological measures and help to prevent new waves of the COVID-19 epidemic.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Authors from the Originating laboratories for obtaining specimens as well as the Submitting laboratories where the genome data were generated and shared via GISAID, on which our research is based.

Funding

A part of this work was funded by the National Research Foundation of Ukraine in the framework of a project "Combined test systems for diagnosis and analysis of innate immunity gene expression upon dangerous viral infections" (2020.01/0091) and by other scientific programs of the National Academy of Sciences of Ukraine.

Conflict of interest. The authors declare that they have no conflict of interest.

Statement of compliance with standards of research involving humans as subjects. All procedures carried out in the studies involving people were consistent with international and national standards, the Helsinki Declaration of 1964, and its later amendments, and approved by the Bioethics Commission of the Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine (IMBG Ethical Approval protocol № 2/23.03.2021).

REFERENCES

1. *Awadasseid A, Wu Y, Tanaka Y, Zhang W.* SARS-CoV-2 variants evolved during the early stage of the pandemic and effects of mutations on adaptation in Wuhan populations. *Int J Biol Sci.* 2021;**17**(1):97–106.
2. *Giovanetti M, Benedetti F, Campisi G, Ciccozzi A, Fabris S, Ceccarelli G, Tambone V, Caruso A, Angeletti S, Zella D, Ciccozzi M.* Evolution patterns of SARS-CoV-2: Snapshot on its genome variants. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021;**538**:88–91.
3. *Danchin A, Timmis K.* SARS-CoV-2 variants: Relevance for symptom granularity, epidemiology, immunity (herd, vaccines), virus origin and containment? *Environ Microbiol.* 2020;**22**(6):2001–6.
4. *Dos Santos WG.* Impact of virus genetic variability and host immunity for the success of COVID-19 vaccines. *Biomed Pharmacother.* 2021;**136**:111272.
5. *Amanat F, Krammer F.* SARS-CoV-2 Vaccines: Status Report. *Immunity.* 2020;**52**(4):583–589.
6. *Liu Y, Liu J, Plante KS, Plante JA, Xie X, Zhang X, Ku Z, An Z, Scharton D, Schindewolf C, Menachery VD, Shi PY, Weaver SC.* The N501Y spike substitution enhances SARS-CoV-2 transmission. *bioRxiv [Preprint].* 2021:2021.03.08.434499.

Ідентифікація та характеристика штаму B.1.1.7 SARS-CoV-2 при новому спалаху у лютому 2021 COVID-19 в Україні

В. І. Кашуба, Н. В. Грищенко, Г. В. Геращенко,
Н. С. Мельничук, Т. В. Марчишак,
С. Ю. Чернушин, Л. М. Черненко, В. К. Ляшко,
З. Ю. Ткачук, М. А. Тукало

Мета. Виявити та охарактеризувати штами SARS-CoV-2, зібрані під час нової хвилі спалаху COVID-19 в Івано-Франківській області України, використовуючи повногеномне генотипування вірусу. **Методи.** Секвенування нового покоління вірусного геному проводили на тотальній РНК, виділеній з мазків носоглотки 19 пацієнтів, за допомогою системи IonGeneStudio-S5Plus. **Результати.** Всі ідентифіковані генотипи SARS-CoV-2 були віднесені до класу 20I/501Y.V1, варіант VUI202012/01GRY (штам B.1.1.7). В аналізованих варіантах вірусу було виявлено сорок сім різних мутацій. Окрім місенс-мутацій, характерних для засновника 20I/501Y.V1, було виявлено кілька унікальних змін, у тому числі в S- та N-білках SARS-CoV-2, які можуть мати клінічну та епідеміологічну значимість. **Висновки.** Сучасна хвиля спалаху COVID-19 в Україні пов'язана не тільки із сезонними коливаннями передачі вірусу, але і з появою більш агресивних вірулентних варіантів, таких як B.1.1.7, який в основному витіснив попередні штами і здатен уражувати більш молоде населення.

Ключові слова: SARS-CoV-2, повногеномне генотипування, мутації

Идентификация и характеристика штамма B.1.1.7 SARS-CoV-2 при новой вспышке в феврале 2021 COVID-19 в Украине

В. И. Кашуба, Н. В. Грищенко, А. В. Геращенко,
Н. С. Мельничук, Т. В. Марчишак,
С. Ю. Чернушин, Л. Н. Черненко, В. К. Ляшко,
З. Ю. Ткачук, М. А. Тукало

Цель. Выявить и охарактеризовать штаммы SARS-CoV-2, собранные во время новой волны вспышки COVID-19 в Ивано-Франковской области Украины, используя полногеномное генотипирование вируса. **Методы.** Секвенирование нового поколения вирусного генома проводили на тотальной РНК, выделенной из мазков носоглотки 19 пациентов, с помощью системы IonGeneStudioS5Plus. **Результаты.** Все идентифицированые генотипы SARS-CoV-2 были отнесены к классу 20I/501Y.V1, вариант VUI202012/01GRY (штамм B.1.1.7). В рассматриваемых вариантах вируса было обнаружено сорок семь различных мутаций. Кроме миссенс-мутаций, характерных для основателя 20I/501Y.V1, было обнаружено несколько уникальных изменений, в том числе в S- и N-белках SARS-CoV-2, которые могут иметь клиническую и эпидемиологическую значимость. **Выводы.** Современная волна вспышки COVID-19 в Украине связана не только с сезонными колебаниями передачи вируса, но и с появлением более агрессивных вирулентных вариантов, таких как B.1.1.7, который в основном вытеснил предыдущие штаммы и способен поражать более молодое население.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, полногеномное генотипирование, мутации

Received 20.02.2021