

ВАРИАНТ rs657152 НЕ АССОЦИИРУЕТСЯ С УРОВНЕМ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ ПРИ COVID-19 ИЛИ ВЕРОЯТНОСТЬЮ ЗАБОЛЕВАНИЯ В ПОПУЛЯЦИИ ЕВРОПЕОИДОВ ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ

© 2021 г. Е. А. Орлова¹, О. Б. Огарков¹ *, П. А. Хромова¹, В. В. Синьков¹, М. А. Хаснатинов¹, С. Н. Жданова¹, Л. В. Рычкова¹, Л. И. Колесникова¹

¹“Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека”, Иркутск, 664003 Россия

*e-mail: obogarkov@sbamsr.irk.ru

Поступила в редакцию 19.09.2020 г.

После доработки 21.10.2020 г.

Принята к публикации 27.10.2020 г.

Перекрестно воспроизводящиеся ассоциации rs657152 в локусе 9q34.2с и rs11385942 в локусе 3p21.31, обнаруженные у больных с тяжелым течением COVID-19 в популяции европеоидов, требуют изучения выявленного феномена в различных популяциях, в том числе, в качестве самостоятельного биологического маркера. Разработаны праймеры и TaqMan-зонды для ПЦР-дискриминации аллелей А и С при однонуклеотидном полиморфизме (SNP) rs657152. Определяли варианты локуса rs657152 А/С у 129 больных COVID-19 и в контрольной группе из 466 здоровых индивидов. Между больными и здоровыми не обнаружено значимых отличий по частотам распределения аллелей А и С: 0.47/0.53 и 0.45/0.55 соответственно. Также не обнаружено различий в распределении аллелей у больных с высокой вирусной нагрузкой в мазке (Ст в диапазоне 16–25), по сравнению со средней и низкой вирусной нагрузкой (Ст в диапазоне 26–40).

Ключевые слова: COVID-19, rs657152, дискриминация аллелей, ПЦР, TaqMan-зонды.

DOI: 10.31857/S0016675821080099

Коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2) впервые был идентифицирован в городе Ухань, Китай, в конце 2019 г., а заболевание, получившее название COVID-19, быстро превратилось в глобальную пандемию [1]. Существуют значительные вариации в протекании болезни среди пациентов, пораженных вирусом SARS-CoV-2. На первых этапах пандемии страны Европы столкнулись с гораздо большим числом случаев заболевания и смертей от COVID-19, чем Восточная Азия и Россия. Механизмы, которые определяют, почему в одних популяциях возникает больше тяжелых случаев болезни, а в других нет, мало изучены. Патогенез тяжелых форм COVID-19 и связанной с ним дыхательной недостаточности исследован недостаточно, однако более высокая смертность ассоциирована с пожилым возрастом и мужским полом [2, 3], рядом сердечно-сосудистых заболеваний и артериальной гипертензией, ожирением и диабетом [4–6]. Полногеномным анализом ассоциаций (GWAS) [7] были выявлены потенциальные генетические факторы, участвующие в развитии COVID-19 [8]. При исследовании 1980 больных из Италии и Испании выявлены перекрестно воспроизводящиеся ассоциации с вариантом rs11385942 в локусе

3p21.31 и с rs657152 в локусе 9q34.2, которые являлись значимыми на полногеномном уровне [8].

Цель данной работы – разработка ПЦР-теста с TaqMan-зондами, пригодного для дискриминации аллелей А и С rs657152, и сравнительная оценка распределения генотипов в группах больных COVID-19 и здоровых лиц – представителей европеоидного населения (славяне) Иркутской обл.

Соблюдение этических норм. Настоящее исследование одобрено Этическим комитетом ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ. Сбор клинического материала (мазков нос/глотка) произведен в рамках рутинных противоэпидемических процедур обследований населения Иркутской обл. на пораженность вирусом SARS-CoV-2. Выделение РНК/ДНК из образцов проводили набором “РеалБест экстракция”, ПЦР диагностику набором “РеалБест РНК SARS-CoV-2”. К группе больных были отнесены лица, имеющие диагноз COVID-19 и положительный ПЦР-тест на РНК вируса. К здоровому контролю отнесены контактные лица, проходившие обследование и не имевшие позитивного ПЦР-результата на РНК вируса, диагнозов ОРВИ или COVID-19. Расчет структуры и длины праймеров и зондов для дискриминации аллелей А и С rs657152 (табл. 1) произведен вручную по референсной нуклеотид-

Таблица 1. Список использованных праймеров и зондов

Праймеры/Зонды	Последовательность 5'→3'	Длина ампликона, пн	Отжиг, °C
657152F	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	103	56
657152R	AATTTAGGACATGTAAGTTCA		56
657152A	[FAM]TCTCGAATAGCTTCTTGAAAC[A-LNA]G[BHQ1]		66
657152C	[R6G]CTCGAATAGCTTCTTGAAAC[C-LNA]G[BHQ1]		66

Таблица 2. Характеристика обследованных выборок

Показатель	Контроль	Пациенты с COVID-19
<i>N</i>	<i>N</i> = 466	<i>N</i> = 129
Мужчины, % (<i>N</i>)	33.0 (154)	41.1 (53)
Женщины, % (<i>N</i>)	67.0 (312)	58.9 (76)
Возраст, лет	41.0 ± 16.1	38.8 ± 21.5
Генотип rs657152 AA	101	34
Генотип rs657152 AC	215	54
Генотип rs657152 CC	150	41
Аллель А	417 (0.45)	122 (0.47)
Аллель С	515 (0.55)	136 (0.53)
Отклонение от равновесия Харди–Вайнберга	<i>P</i> > 0.05	<i>P</i> > 0.05
Пороговое значение ПЦР (Ct) при выявлении SARS-CoV-2	–	35.0 ± 5.5

ной последовательности локуса *ABO* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs657152>).

Синтез праймеров и зондов осуществлен ООО “Люмипроб РУС”. ПЦР проводили в варианте с детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ) на амплификаторе CFX (БиоРад) с использованием БиоМастер HS-qPCRHi-ROX (ООО “БИОЛАБ-МИКС”) и эквимольными концентрациями праймеров (0.5 мкМ) и зондов (0.1 мкМ) соответственно. Режим амплификации: 95° – 5 мин, 40 циклов, 95° – 10 с, 55° – 10 с; 72° – 10 с. Расчет статистических данных, включая оценку отклонения от равновесия Харди–Вайнберга, проводили в таблицах Эксель (табл. 2); отклонения были статистически незначимыми.

Исходной задачей исследования было создание двух ПЦР-тестов для выявления перекрестно воспроизводимой ассоциации rs657152 в локусе 9q34.2с и rs11385942 в локусе 3p21.31 [8]. К сожалению, выявление инсерции–делеции GA/G в локусе 3p21.31 (rs11385942) TaqMan ПЦР-тестом оказалось технически сложным (данные не приводятся), и дискриминации аллелей во втором тесте добиться не удалось. В результате этого исследование было проведено только по SNP rs657152.

Группы больных и здорового контроля значительно не различались по полу и возрасту. Как видно из табл. 2, объем полученных выборок позволил достичь соотношения генотипов, значимо не от-

личающегося от ожидаемого по Харди–Вайнбергу. Анализ полученных результатов не выявил каких-либо различий в распределении генотипов или аллелей между группой больных COVID-19 и группой здоровых лиц. Нам также не удалось обнаружить существенных различий в распределении аллелей у больных COVID-19 с высокой вирусной нагрузкой в мазке (Ct в диапазоне 16–25) по сравнению с больными COVID-19 со средней и низкой вирусной нагрузкой (Ct в диапазоне 26–40).

Сравнение полученных частот аллелей с данными базы данных dbSNP (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs657152#frequency_tab) выявило значимые различия ($\chi^2 = 13.2$, $P < 0.001$) исследуемой контрольной группы в распределении частот А- и С-аллелей (0.45/0.55) по отношению к глобальному (0.39/0.61) распределению. Аналогичное сравнение распределения А- и С-аллелей (0.45/0.55) с европеоидной популяцией (0.37/0.63) также показало существенные различия ($\chi^2 = 23.1$, $P < 0.001$). Следует отметить, что аллель А rs657152 характеризуется как “аллель риска по COVID-19” вместе с вариантом GA rs11385942 [8]. Полученные результаты по распределению rs657152 аллеля А наиболее близки (территориально и этнически) к его распределению на территории Эстонии (0.44) и Финляндии (0.47) [8]. Исследование распределения аллелей rs657152 на территории России, по всей видимости, до настоящего времени не проводилось.

Таким образом, выявление аллеля А при анализе SNP rs657152 в популяции европеоидного населения (славяне) Иркутской обл. в самостоятельном виде не может рассматриваться как фактор риска более тяжелого течения COVID-19.

Данная работа выполнена в рамках НИР ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (Иркутск) с использованием оборудования ЦКП “Центр разработки прогрессивных персонализированных технологий здоровья”.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национально-го комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhu N., Zhang D., Wang W. et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019 // *N. Engl. J. Med.* 2020. V. 382. P. 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>
2. Zhou F., Yu T., Du R. et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: A retrospective cohort study // *Lancet.* 2020. V. 395. P. 1054–1062. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)
3. Li X., Xu S., Yu M. et al. Risk factors for severity and mortality in adult COVID-19 inpatients in Wuhan // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2020. V. 146(1). P. 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.04.006>
4. Chen R., Liang W., Jiang M. et al. Risk factors of fatal outcome in hospitalized subjects with coronavirus disease 2019 from a nationwide analysis in China // *Chest.* 2020. V. 158(1). P. 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2020.04.010>
5. Docherty A.B., Harrison E.M., Green C.A. et al. Features of 20133 UK patients in hospital with Covid-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterisation Protocol: Prospective observational cohort study // *BMJ.* 2020. V. 369. m1985. <https://doi.org/10.1136/bmj.m1985>
6. Richardson S., Hirsch J.S., Narasimhan M. et al. Presenting characteristics, comorbidities, and outcomes among 5700 patients hospitalized with COVID-19 in the New York City area // *JAMA.* 2020. V. 323(20). P. 2052–2059. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.6775>
7. Kraft P., Zeggini E., Ioannidis J.P.A. Replication in genome-wide association studies // *Statist. Sci.* 2009. V. 24(4). P. 561–573. <https://doi.org/10.1214/09-STS290>
8. Ellinghaus D., Degenhardt F., Bujanda L. et al. Genomewide association study of severe Covid-19 with respiratory failure // *N. Engl. J. Med.* 2020. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2020283>

SNP rs657152 Is Not Associated with the Level of Viral Load in COVID-19 or the Probability of Disease in the Population of Caucasians in Eastern Siberia

E. A. Orlova^a, O. B. Ogarkov^{a,*}, P. A. Khromova^a, V. V. Sinkov^a, M. A. Khasnatinov^a, S. N. Zhdanova^a, L. V. Rychkova^a, and L. I. Kolesnikova^a

^aScientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, 664003 Russia

*e-mail: obogarkov@sbamsr.irk.ru

Cross-replicating associations with rs657152 at the 9q34.2c locus and rs11385942 at the 3p21.31 locus found in patients with severe COVID-19 in the Caucasian population require the study of the discovered phenomenon in various populations, including as an independent biological marker. Primers and TaqMan probes for PCR discrimination of A and C alleles in single nucleotide polymorphism (SNP) rs657152 have been developed. The polymorphism of the rs657152 A/C locus was determined in 129 patients with COVID-19 and in a control group of 466 healthy individuals. There were no significant differences in the frequency of distribution of the A and C alleles, 0.47/0.53 and 0.45/0.55, between patients and healthy subjects, respectively. Also, no differences were found in the distribution of alleles in patients with high viral load in the smear (Ct in the range of 16–25), compared with the average and low viral load (Ct in the range of 26–40).

Keywords: COVID-19, rs657152, allele discrimination, PCR, TaqMan probes.