

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-94-100

УДК 616.98:578.834.1

А.В. Зайковская, А.В. Гладышева, М.Ю. Карташов, О.С. Таранов, А.С. Овчинникова,
А.В. Шиповалов, О.В. Пьянков

ИЗУЧЕНИЕ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММОВ КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2, ОТНОСЯЩИХСЯ К РАЗЛИЧНЫМ ГЕНЕТИЧЕСКИМ ВАРИАНТАМ

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Новосибирская область, Российская Федерация

Цель – изучить особенности репродукции штаммов вируса SARS-CoV-2 различных генетических вариантов на культурах клеток Vero и Vero E6. **Материалы и методы.** В работе использовали штаммы вируса SARS-CoV-2, относящиеся к вариантам, вызывающим обеспокоенность (VOC), циркулирующим на территории РФ. Штаммы вируса SARS-CoV-2 депонированы в Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Эксперименты проводили на культурах клеток Vero и Vero E6. Динамику накопления инфекционного вируса определяли путем титрования образцов культуральной жидкости через 24, 48, 72, 96 часов после инфицирования (MOI – от 1 до 0,00001 ЦПД₅₀/клетку). Образование бляшек изучали на культуре клеток Vero E6 под 0,2 % агаровым покрытием. Анализ изображения и подсчет размеров бляшек проводили в графическом редакторе GIMP (GNU Image Manipulation Program). **Результаты и обсуждение.** Описана динамика накопления инфекционного вируса в культуральной жидкости в зависимости от множественности инфицирования для штаммов вируса SARS-CoV-2, относящихся к разным генетическим линиям. Показаны различия морфологии бляшек на монослое культуры клеток Vero E6 под агаровым покрытием. Вирусы SARS-CoV-2, относящиеся к генетическим вариантам альфа и дельта, демонстрируют максимальную репродукцию среди изученных штаммов (инфекционный титр – более 7 lg TCID₅₀/100мкл). Вариант омикрон под агаровым покрытием образует самые мелкие бляшки и при низкой множественности инфицирования имеет низкий уровень репродукции. Таким образом, штаммы коронавируса SARS-CoV-2, относящиеся к разным генетическим линиям, имеют существенные отличия в скорости репродукции на культуре клеток Vero и Vero E6.

Ключевые слова: коронавирус SARS-CoV-2, VOC, культура клеток Vero, культура клеток Vero E6, титр вируса, образование бляшек.

Корреспондирующий автор: Зайковская Анна Владимировна, e-mail: zaykovskaya_av@vector.nsc.ru.

Для цитирования: Зайковская А.В., Гладышева А.В., Карташов М.Ю., Таранов О.С., Овчинникова А.С., Шиповалов А.В., Пьянков О.В. Изучение в условиях *in vitro* биологических свойств штаммов коронавируса SARS-CoV-2, относящихся к различным генетическим вариантам. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 1:94–100. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-94-100

Поступила 02.02.2022. Принята к публ. 25.02.2022.

A.V. Zaykovskaya, A.V. Gladysheva, M.Yu. Kartashov, O.S. Taranov, A.S. Ovchinnikova,
A.V. Shipovalov, O.V. P'yankov

In vitro Study of Biological Properties of SARS-CoV-2 Coronavirus Strains Related to Various Genetic Variants

State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Abstract. The aim of the research was to study reproduction features of SARS-CoV-2 coronavirus strains of various genetic lines on Vero and Vero E6 cell culture. **Materials and methods.** The SARS-CoV-2 virus strains related to the variants of concern (VOC) circulating in the territory of the Russian Federation were used in the research. The strains of the SARS-CoV-2 virus were deposited in the State Collection of Pathogens of Viral Infections and Rickettsioses at the FBIS SSC VB “Vector” of the Rospotrebnadzor. The experiments were carried out on Vero and Vero E6 cell cultures. The dynamics of infectious virus accumulation was determined by titration of culture fluid samples 24, 48, 72, 96 hours after infection (MOI – from 1 to 0,00001 CPE₅₀/cell). Plaque formation was studied on Vero E6 cell culture under 0.2 % agar coating. Image analysis and plaque size calculation were performed using GIMP (GNU Image Manipulation Program). **Results and discussion.** The study describes the dynamics of accumulation of infectious virus in the culture fluid depending upon multiplicity of infection for the strains of SARS-CoV-2 virus belonging to different genetic lines. Differences in the morphology of plaques on the monolayer of Vero E6 cell culture under agar coating are shown. SARS-CoV-2 virus strains related to Alfa and Delta VOC demonstrate maximum reproduction rate among the studied strains (infectious titer is higher than 7 lg TCID₅₀/100μl). Omicron VOC forms small plaques under agar coating and at a low multiplicity of infection has a low reproduction rate. Thus, SARS-CoV-2 virus strains belonging to different genetic lines have significant differences in the rate of reproduction on Vero and Vero E6 cell culture.

Key words: SARS-CoV-2 coronavirus, VOC, Vero cell culture, Vero E6 cell culture, virus titer, plaque formation.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Anna V. Zaykovskaya, e-mail: zaykovskaya_av@vector.nsc.ru.

Citation: Zaykovskaya A.V., Gladysheva A.V., Kartashov M.Yu., Taranov O.S., Ovchinnikova A.S., Shipovalov A.V., P'yankov O.V. *In vitro* Study of Biological Properties of SARS-CoV-2 Coronavirus Strains Related to Various Genetic Variants. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 1:94–100. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-94-100

Received 02.02.2022. Accepted 25.02.2022.

Zaykovskaya A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0450-5212>
Gladysheva A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7396-3954>
Kartashov M.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7857-6822>
Taranov O.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6746-8092>

Ovchinnikova A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1745-7643>
Shipovalov A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1201-8307>
P'yankov O.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3340-8750>

На сегодняшний день в мире зарегистрировано более 418 млн случаев COVID-19, из них 5,9 млн – с летальным исходом. В России число заболевших, выявленных за сутки, стремительно растет в результате распространения нового генетического варианта вируса SARS-CoV-2 омикрон, на начало 2022 г. их число превысило 15 млн [1].

Новый коронавирус SARS-CoV-2, как и большинство РНК-содержащих вирусов, при адаптации к новым хозяевам склонен к генетической эволюции. Частое появление мутаций в геноме приводит к возникновению вариантов, которые могут иметь характеристики, отличные от предковых штаммов [2].

Варианты, ответственные за тяжелое течение заболевания, снижение эффективности лечения, характеризующиеся повышенной трансмиссивностью и рядом других свойств, вызывающих обеспокоенность, получили название VOC (Variant of Concern). На данный момент Всемирная организация здравоохранения выделяет пять основных VOC: альфа (линия B.1.1.7), который впервые выделен в Великобритании [3–4], бета (линия B.1.351) – в Южной Африке [5], гамма (линия B.1.1.28.1 или P.1) – в Бразилии [6–8], дельта (линия B.1.617.2) – в Индии [9], омикрон (линия B.1.1.529) – в Южной Африке совсем недавно [10]. Каждый из генетических вариантов VOC имеет ключевые мутации, которые оказывают влияние на биологические свойства вируса [11].

Многие из аминокислотных замен, обнаруженных у VOC, расположены в рецептор-связывающем домене (receptor-binding domain, RBD) S-белка вируса SARS-CoV-2 [12]. Вариант альфа (B.1.1.7) из 17 мутаций в вирусном геноме 8 (69-70del, 144 del, N501Y, A570D, P681H, T716I, S982A, D1118H) имеет в S-белке. Вариант бета (B.1.351) включает 9 замен (L18F, D80A, D215G, R246I, K417N, E484K, N501Y, D614G и A701V) в S-белке, из которых 3 (K417N, E484K и N501Y) расположены в RBD. Вариант гамма (B.1.1.28) содержит 11 мутаций в S-белке (L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, H655Y, T1027I, V1176, K417T, E484K и N501Y), из них 3 (L18F, K417N, E484K) расположены в RBD. Вариант дельта (B.1.617.2) несет 10 аминокислотных замен (T19R, (G142D*), 156del, 157del, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N) в S-белке. На юге Африки 26 ноября 2021 г. впервые выявлен новый, имеющий наибольшее количество мутаций вариант вируса SARS-CoV-2, который получил название омикрон. Данные анализа его генома показали наличие более 30 генетических изменений в S-белке вируса.

Использование молекулярно-генетических методов исследования вирусов, таких как секвенирование, позволяет быстро регистрировать вновь возникающие генетические линии вируса SARS-CoV-2

и картировать мутации. Однако для изучения биологических свойств вновь выявляемых генетических вариантов необходимо также использовать классические вирусологические способы их индикации и идентификации. Клеточные культуры являются наглядной моделью для изучения биологии вируса и особенностей взаимодействия с клеткой хозяина в условиях *in vitro*. Многие скрининговые исследования возбудителя COVID-19 проведены на клеточных линиях почки африканской зеленой мартышки Vero E6 и Vero-CCL81, поскольку они экспрессируют большое количество рецептора ACE2 [13–14]. Возникновение и накопление мутаций в геноме коронавируса приводят к изменению его биологических свойств. Особенности репродукции на культурах клеток являются одной из важных характеристик штамма изучаемого вируса.

Целью настоящей работы являлось изучение особенностей репродукции штаммов вируса SARS-CoV-2 различных генетических вариантов в культуре клеток Vero и Vero E6. Исследование проводили путем определения динамики накопления инфекционного вируса в культуральной жидкости в зависимости от множественности инфицирования и анализа морфологии бляшек.

Материалы и методы

Культуры клеток. Исследования проводили на линии клеток Vero и Vero E6 (клетки эпителия почки африканской зеленой мартышки), полученных из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Клетки культивировали в среде DMEM (Gibco, США) с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone, США) и комплексного антибиотика (Gibco, США) в атмосфере 5 % CO₂ при температуре 37 °C. В качестве поддерживающей среды при культивировании вируса также использовали DMEM, но с добавлением 2 % эмбриональной сыворотки.

Вирусы. В работе использовали штаммы коронавируса, выделенные от больных на территории РФ и относящиеся к вызывающим обеспокоенность генетическим вариантам. Штаммы предварительно были наработаны на культуре клеток Vero E6, охарактеризованы и депонированы в Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Сведения о происхождении, принадлежности к генетическим вариантам, инфекционных титрах штаммов коронавируса, использованных в экспериментах, представлены в таблице.

Выделение изолятов вируса. Образцы носоглоточных смывов, полученные от больных COVID-19, осветляли центрифугированием, фильтровали через

Информация о штаммах коронавируса SARS-CoV-2, использованных в эксперименте
Data on SARS-CoV-2 coronavirus strains used in the experiment

Штамм коронавируса Strain of coronavirus (GISAID ID)	Место, дата выделения Site, date of isolation	Название варианта VOC (country of origin)	Генетический вариант Genetic variant	Титр (lg ШПД50/100мкл)±m Titer (lg TCD50/100μl)±m				
				1-й пассаж 1st passage	2-й пассаж 2nd passage	3-й пассаж 3rd passage	4-й пассаж 4th passage	5-й пассаж 5th passage
hCoV-19/Australia/VIC01/2020 (EPI_ISL_406844)	Австралия, январь 2020 Australia, January 2020	не является VOC not a VOC	B	н.д. n.d.	н.д. n.d.	6,0±0,29	7,0±0,25	7,5±0,47*
hCoV-19/Russia/Omsk202118_1707/2020 (EPI_ISL_1242008)	Омск, июль 2020 Omsk, July 2020	не является VOC not a VOC	B.1.1	6,0±0,25	6,25±0,38	5,5±0,25*	н.д. n.d.	н.д. n.d.
hCoV-19/Russia/MOS-2512/2020 (EPI_ISL_6565012)	Москва, декабрь 2020 Moscow, December 2020	Альфа (Великобритания) Alpha (UK)	B.1.1.7	6,5±0,0	6,75±0,25	6,75±0,25	7,2±0,38*	н.д. n.d.
hCoV-19/Russia/MOS-SAB-1502/2021 (EPI_ISL_6492245)	Москва, февраль 2021 Moscow, February 2021	Бета (Южная Африка) Beta (South Africa)	B.1.351	3,5±0,35	5,5±0,0	6,75±0,38	6,3±0,17*	н.д. n.d.
hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021 (EPI_ISL_6565014)	Якутск, май 2021 Yakutsk, May 2021	Гамма (Бразилия) Gamma (Brazil)	P.1	4,75±0,17	5,5±0,38	6,3±0,17*	н.д. n.d.	н.д. n.d.
hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021 (EPI_ISL_7338814)	Псков, апрель 2021 Pskov, April 2021	Дельта (Индия) Delta (India)	B.1.617.2	6,75±0,25	6,5±0,00	6,75±0,25	7,0±0,47*	н.д. n.d.
hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021 (EPI_ISL_8920444)	Москва, декабрь 2021 Moscow, December 2021	Омикрон (Южная Африка) Omicron (South Africa)	B.1.1.529	без ШПД without cytopathic effect	3,5±0,25	6,0±0,17*	н.д. n.d.	н.д. n.d.

Примечание: * – пассаж и инфекционный титр штамма, использованного в исследовании; н.д. – нет данных.

Note: * – passage and infectious titer of the strain used in the study; n.d. – no data.

насадки Millex с диаметром пор 0,22 мкм (Merck Millipore, США) и высевали на монослой культуры клеток Vero и Vero E6, выращенных в культуральных флаконах площадью поверхности 25 см² (Corning, США). Инкубацию инфицированных культур клеток проводили при температуре 37 °С в течение 5 суток или до появления цитопатического действия вирусов (ЦПД). Наличие вируса в культуральной жидкости подтверждали, используя набор реагентов «Вектор-ПЦРв-2019-nCoV-RG» (ГНЦ ВБ «Вектор», Россия).

Определение титра вируса. Культуру клеток выращивали в 96-луночном культуральном планшете. После удаления ростовой среды из лунок планшета в них вносили последовательные десятикратные разведения вирусосодержащей жидкости в поддерживающей среде в трех повторях и инкубировали в течение 4 суток в атмосфере 5 % CO₂ при температуре 37 °С, после чего окрашивали. Для этого в каждую лунку планшета вносили по 100 мкл 0,2 % раствора генцианвиолета (1 г генцианвиолета растворяли в 20 мл 96 % этилового спирта, добавляли 120 мл 40 % формалина и 350 мл раствора Хенкса). Через 30 минут жидкость удаляли и планшеты промывали водой. Специфическое поражение монослоя культуры клеток в лунке учитывали как ЦПД. Расчет титра вируса проводили по формуле Рида – Менча и выражали в lg ЦПД₅₀/мл [15].

Изучение морфологии бляшек под агаровым покрытием. Монослой культуры клеток выращивали в 24-луночных культуральных планшетах. Удаляли из лунок ростовую среду, вносили инфицирующую жидкость при множественности заражения (multiplicity of infection, MOI), равной 0,001 ЦПД₅₀/клетку, для каждого штамма коронавируса. После завершения экспозиции в атмосфере 5 % CO₂ при температуре 37 °С в течение 1 часа монослой промывали однократно, затем в лунки вносили агаровое покрытие следующего состава: культуральная среда «Игла MEM с L-глутамином с двойным набором аминокислот» («Биолот», Россия) с антибиотиками 100 ЕД/мл (Antibiotic-Antimycotic; Gibco, США), 5 % эмбриональной сыворотки коров (Gibco, США), 0,2 % агара (бакто-агар; Becton Dickinson and Company, США). Культуральные планшеты инкубировали в течение 4 суток в атмосфере 5 % CO₂ при температуре 37 °С, затем окрашивали 0,2 % раствором генцианвиолета.

Динамика накопления инфекционного вируса в культуральной жидкости в зависимости от множественности инфицирования. Монослой культуры клеток выращивали в 48-луночных культуральных планшетах, инфицировали разведениями каждого штамма коронавируса при MOI от 1 до 0,00001 ЦПД₅₀/клетку в трех повторях. После экспозиции в течение 1 часа при температуре 37 °С промывали трехкратно, затем добавляли поддерживающую среду DMEM (Gibco, США) с L-глутамином, с добавлением 2 % эмбриональной телячьей сыворотки

(Gibco, США), Antibiotic-Antimycotic (Gibco, США). Через 24, 48, 72, 96 часов после инфицирования пробы культуральной жидкости из каждой лунки титровали на монослой культуры клеток.

Анализ данных. Анализ данных проводили с использованием программы Microsoft Excel, анализ изображения и подсчет размеров бляшек – с помощью графического редактора GIMP (GNU Image Manipulation Program).

Результаты и обсуждение

В работе использовано семь штаммов коронавируса SARS-CoV-2, которые выделены в разные периоды пандемии и относятся к разным генетическим вариантам. Штамм hCoV-19/Australia/VIC01/2020 (вариант B) любезно предоставлен Mike Catton (Victorian Infectious Diseases Reference Laboratory, Мельбурн, Австралия) в феврале 2020 г. и использован в качестве референс-штамма. Первый подъем заболеваемости коронавирусной инфекции на территории РФ был вызван генетическим вариантом B.1.1 (не является VOC). Штамм hCoV-19/Russia/Omsk202118_1707/2020 относится к этой линии. Штаммы hCoV-19/Russia/MOS-2512/2020 (B.1.1.7, альфа), hCoV-19/Russia/MOS-SAB-1502/2021 (B.1.351, бета) и hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021 (B.1.1.28.1, гамма) принадлежат к VOC и характеризуются высокой трансмиссивностью, повышенными показателями смертности и вовлечением в эпидемический процесс, помимо пожилых людей, лиц более молодого возраста [3]. Вариант дельта представлен штаммом hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021 (B.1.617.2), при заражении которым повышается тяжесть заболевания и уровень госпитализации среди заболевших [16]. Первые изоляты этой генетической линии выявлены на территории России весной 2021 г. В связи со снижением связывающей активности нейтрализующих антител, приобретенных как после заболевания более ранним вариантом вируса SARS-CoV-2, так и после вакцинации, штаммы линии дельта быстро стали доминирующими среди вновь выделяемых коронавирусов. Генетический вариант омикрон (B.1.1.529) – штамм hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021 – появился на территории России недавно, в настоящее время активно распространяется благодаря высокой скорости передачи внутри популяции.

Для первичного выделения штаммов использовали две перевиваемые культуры клеток Vero и Vero E6. Все изоляты при первом пассаже успешно культивировались. Однако при выделении штамма hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021 на Vero на первом пассаже не зарегистрировано ЦПД, в то время как на Vero E6 оно было хорошо выражено. Штамм hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021 выделен на культуре клеток Vero E6, на первом пассаже ЦПД не зафиксировано. Такого рода избирательный цитопатический эффект различных гене-

тических вариантов вируса SARS-CoV-2 на клетки Vero E6 может быть ассоциирован с оксидативным стрессом, связанным со значительным снижением уровня клеточных тиолов (прежде всего восстановленной формы глутатиона), развивающимся уже в первые сутки после инфицирования клеток корона-вирусом [17].

При проведении вирусологических исследований большое значение имеет получение пулов вируса с высокими инфекционными титрами. Скорость репродукции конкретного штамма вируса является важной характеристикой его биологических свойств, зависящих от изменяемой мутациями архитектуры вирусной частицы. Для оценки влияния аминокислотных замен в S-белке коронавирусов различных генетических вариантов на их взаимодействие с восприимчивой клеткой проведен эксперимент по изучению динамики накопления инфекционного вируса в культуральной жидкости в зависимости от множественности инфицирования (рис. 1). Анализируя результаты, продемонстрированные на рис. 1, можно сказать, что все приведенные в исследовании штаммы вируса SARS-CoV-2 успешно реплицируются на культуре клеток Vero E6. При больших значениях MOI вирус достаточно быстро начинает репродуцироваться в культуре клеток. Через 24 часа ЦПД визуально не определяется, через 48 часов при высокой множественности (1–0,001) достигает 80–100 %, при этом инфекционные титры резко возрастают. При 100 % повреждении монослоя клеток в дальнейшем вирус начинает терять инфекционность. При MOI, равной 0,0001–0,00001, ЦПД

проявляется позже (48–72 часа) и характеризуется очаговыми повреждениями монослоя. В данном случае инфекционные титры достигают максимальных значений к 96 часам. Согласно результатам исследований, штаммы hCoV-19/Russia/MOS-2512/2020 и hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021 нарабатываются в титрах более 7 lg ЦПД₅₀/100 мкл, что превышает значения для других штаммов. Штамм hCoV-19/Russia/Omsk202118_1707/2020 не имеет мутаций VOC, его уровень репликации сравнительно низкий. При MOI, равном 0,001 и ниже, инфекционные титры коронавируса в культуральной жидкости определяются только через 48 часов. Штамм hCoV-19/Australia/VIC01/2020 также не относится к VOC, но он прошел наибольшее число пассажей на культуре клеток, вероятно, с этим связаны высокие показатели репродукции. Динамика накопления вирусных частиц штамма hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021 отличается от таковой у остальных исследованных штаммов, так как через 96 часов при низкой множественности (0,0001 и ниже) инфекционные титры не поднимаются до максимального значения, а остаются на достаточно низком уровне.

При культивировании вируса SARS-CoV-2 под агаровым покрытием происходит формирование бляшек – специфическое очаговое повреждение монослоя клеток. На основании анализа размера очагов можно судить о скорости распространения коронавируса между соседними клетками монослойной культуры, что позволяет оценить динамику его репродукции. На рис. 2 показаны фотографии монослоя клеточной культуры Vero E6, которые получены при

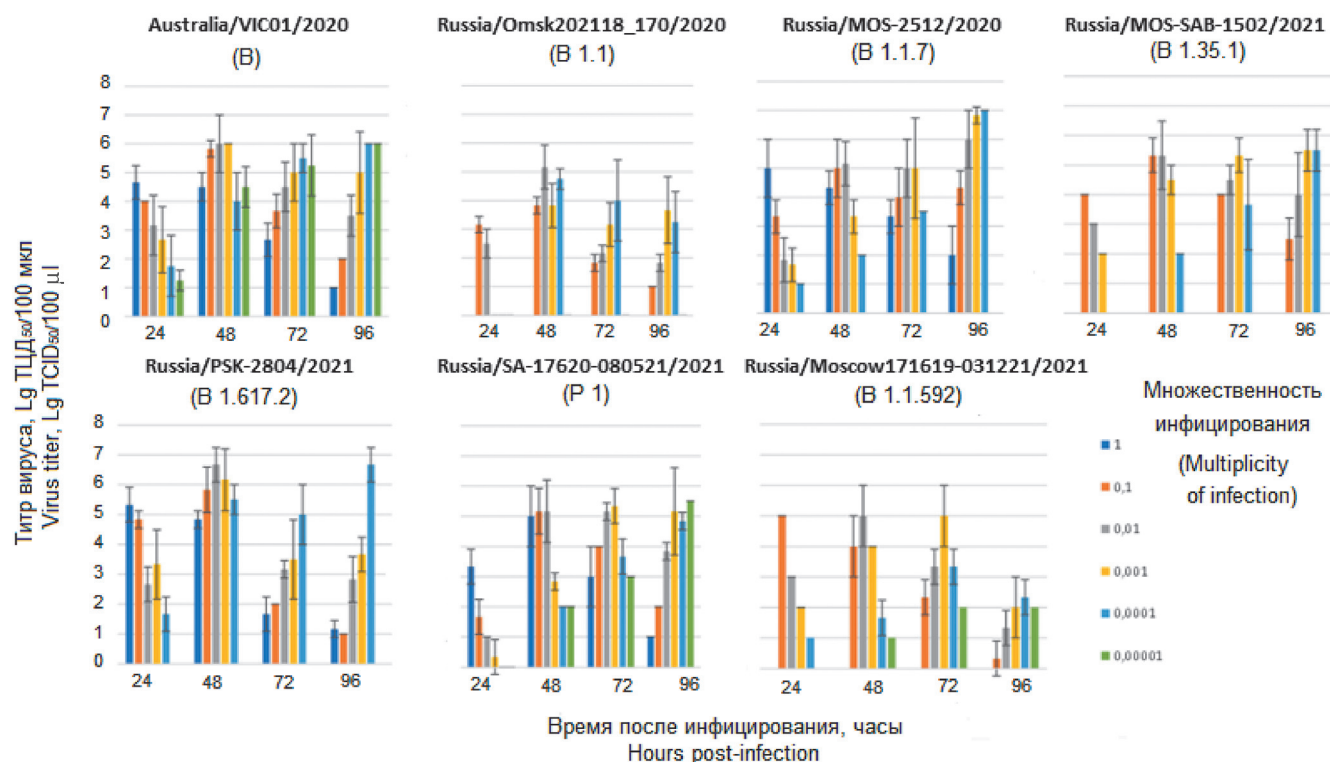


Рис. 1. Динамика репродукции вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero E6 в зависимости от множественности инфицирования

Fig. 1. Dynamics of SARS-CoV-2 virus reproduction in Vero E6 cell culture depending on the multiplicity of infection

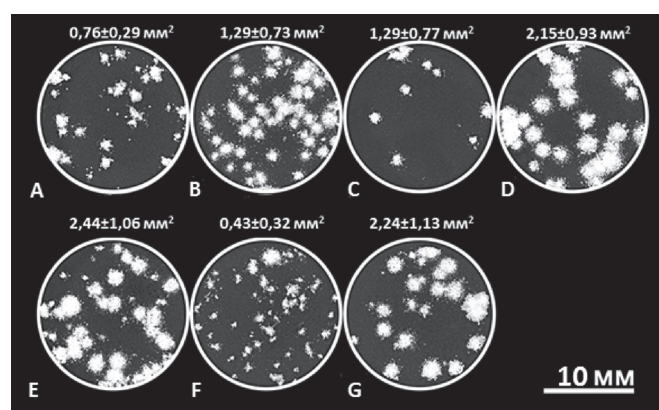


Рис. 2. Образование бляшек на монослой культуры клеток Vero E6 под агаровым покрытием на 4-е сутки после инфицирования. Над каждым рисунком указано среднее значение площади бляшек ± стандартное отклонение:

A – hCoV-19/Australia/VIC01/2020; B – hCoV-19/Russia/MOS-SAB-1502/2021; C – hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021; D – hCoV-19/Russia/MOS-2512/2020; E – hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021; F – hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021; G – hCoV-19/Russia/Omsk202118-1707/2020

Fig. 2. Plaque formation on agar-coated Vero E6 cell culture monolayer at day 4 post-infection. The mean plaque area (±) standard deviation is indicated above each figure:

A – hCoV-19/Australia/VIC01/2020; B – hCoV-19/Russia/MOS-SAB-1502/2021; C – hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021; D – hCoV-19/Russia/MOS-2512/2020; E – hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021; F – hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021; G – hCoV-19/Russia/Omsk202118-1707/2020

инфицировании штаммами коронавируса разных генетических линий. Через 96 часов культивирования в культуре клеток Vero E6 под агаровым покрытием штаммы, использованные в исследовании, формируют очаги повреждения монослоя разного размера, что подтверждает различие скорости репродукции генетических вариантов вируса SARS-CoV-2. Наибольший размер бляшек получен для штаммов hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021 и hCoV-19/Russia/MOS-2512/2020, наименьший – для штамма hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021.

Таким образом, в результате исследований показано, что аминокислотные замены, имеющиеся у вариантов VOC, способствуют более активной репродукции в культуре клеток Vero E6. Мутация N69del, V70del(69), общая для вариантов альфа и омикрон, индуцирует более быстрое слияние клеток и образование многоядерных клеток – синцитии. Еще одна значимая аминокислотная замена – P681H(674) – может увеличивать расщепление S1/S2 фуриноподобными протеазами, усиливать слияние мембран клеток-хозяев вируса и выявлена у вариантов альфа, дельта и омикрон. Мутация N501Y, присутствующая во всех VOC, кроме дельты, увеличивает аффинность связывания с рецептором ACE2, которая еще более усиливается при появлении дополнительной аминокислотной замены Q498R в варианте омикрон, который получает легкий доступ к клетке-хозяину [18, 19]. Сродство RBD к рецептору ACE2 также усиливают такие замены, как T478K, которая присутствует у варианта дельта, L452R – у вариантов дельта и омикрон и E484K – у бета и гамма. Более

того, варианты дельта, гамма и омикрон имеют замену K417N, приводящую к структурным изменениям S-белка, снижающим нейтрализующую активность антител [20, 21].

Результаты представленных исследований демонстрируют, что штаммы вируса SARS-CoV-2, относящиеся к разным генетическим линиям, имеют существенные отличия в скорости репродукции в культуре клеток Vero E6, о чем свидетельствуют значения инфекционных титров в образцах культуральной жидкости и размеры бляшек, образованных под агаровым покрытием. Наличие мутаций у вариантов VOC существенно повышает способность к инфицированию восприимчивых клеток для всех линий вируса SARS-CoV-2, исключая омикрон. Данный вариант вируса под агаровым покрытием образует самые мелкие бляшки и при низкой множественности инфицирования имеет низкий уровень репродукции. В генетическом варианте омикрон наблюдаются серьезные изменения биологических свойств, как было показано ранее, он имеет наибольшее количество мутаций и характеризуется более высокой трансмиссивностью по сравнению с предыдущими вариантами VOC [10], в то же время оказывает менее выраженное повреждающее действие на клетки монослойной культуры Vero E6. Таким образом, увеличение трансмиссивности на фоне снижения патогенности может косвенно свидетельствовать о постепенном снижении вирулентности вновь выявляемых штаммов SARS-CoV-2 до уровня сезонных коронавирусов.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

References / Список литературы

1. World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) dashboard. (Cited 18 Feb 2022). [Internet]. Available from: <https://covid19.who.int>.
2. Shiliaev N., Lukash T., Palchevska O., Crossman D.K., Green T.J., Crowley M.R., Frolova E.I., Frolov I. Natural and recombinant SARS-CoV-2 isolates rapidly evolve *in vitro* to higher infectivity through more efficient binding to heparan sulfate and reduced S1/S2 cleavage. *J. Virol.* 2021; 95(21):e0135721. DOI: 10.1128/JVI.01357-21.
3. Challen R., Brooks-Pollock E., Read J.M., Dyson L., Tsaneva-Atanasova K., Danon L. Risk of mortality in patients infected with SARS-CoV-2 variant of concern 202012/1: matched cohort study. *BMJ.* 2021; 372:n579. DOI: 10.1136/bmj.n579.
4. Volz E., Mishra S., Chand M., Barrett J.C., Johnson R., Geidelberg L., Hinsley W.R., Laydon D.J., Dabrera G., O'Toole A., Amato R., Ragonnet-Cronin M., Harrison I., Jackson B., Ariani C.V., Boyd O., Loman N.J., McCrone J.T., Gonçalves S., Jorgensen D., Myers R., Hill V., Jackson D.K., Gaythorpe K., Groves N., Sillitoe J., Kwiatkowski D.P.; COVID-19 Genomics UK (COG-UK) consortium, Flaxman S., Ratmann O., Bhatt S., Hopkins S., Gandy A., Rambaut A., Ferguson N.M. Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Nature.* 2021; 593(7858):266–9. DOI: 10.1038/s41586-021-03470-x.
5. Yadav P.D., Sarkale P., Razdan A., Gupta N., Nyayanit D.A., Sahay R.R., Potdar V., Patil D.Y., Baradkar S., Kumar A., Aggarwal N., Shete A.M., Kaur H., Mohandas S. Isolation and characterization of SARS-CoV-2 Beta variant from UAE travelers. *J. Infect. Public Health.* 2021; 15(2):182–6. DOI: 10.1016/j.jiph.2021.12.011.
6. Campbell F., Archer B., Laurenson-Schafer H., Jinnai Y., Konings F., Batra N., Pavlin B., Vandemaale K., Van Kerkhove M.D., Jombart T., Morgan O., le Polain de Waroux O. Increased transmissibility and global spread of SARS-CoV-2 variants of concern as at June 2021. *Euro Surveill.* 2021; 26(24):2100509. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.24.2100509.

7. Faria N.R., Mellan T.A., Whittaker C., Claro I.M., Candido D.D.S., Mishra S., Crispim M.A.E., Sales F.C.S., Hawryluk I., McCrone J.T., Hulsmit R.J.G., Franco L.A.M., Ramundo M.S., de Jesus J.G., Andrade P.S., Coletti T.M., Ferreira G.M., Silva C.A.M., Manuli E.R., Pereira R.H.M., Peixoto P.S., Kraemer M.U.G., Gaburo N. Jr., Camilo C.D.C., Hoeltgebaum H., Souza W.M., Rocha E.C., de Souza L.M., de Pinho M.C., Araujo L.J.T., Malta F.S.V., de Lima A.B., Silva J.D.P., Zauli D.A.G., Ferreira A.C.S., Schnekenberg R.P., Laydon D.J., Walker P.G.T., Schlüter H.M., Dos Santos A.L.P., Vidal M.S., Del Caro V.S., Filho R.M.F., Dos Santos H.M., Aguiar R.S., Proença-Modena J.L., Nelson B., Hay J.A., Monod M., Miskouridou X., Coupland H., Sonabend R., Vollmer M., Gandy A., Prete C.A. Jr., Nascimento V.H., Suchard M.A., Bowden T.A., Pond S.L.K., Wu C.H., Ratmann O., Ferguson N.M., Dye C., Loman N.J., Lemey P., Rambaut A., Fraiji N.A., Carvalho M.D.P.S.S., Pybus O.G., Flaxman S., Bhatt S., Sabino E.C. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science*. 2021; 372(6544):815–21. DOI: 10.1126/science.abb2644.
 8. Tegally H., Wilkinson E., Giovanetti M., Iranzadeh A., Fonseca V., Giandhari J., Doolabh D., Pillay S., San E.J., Msomi N., Mlisana K., von Gottberg A., Walaza S., Allam M., Ismail A., Mohale T., Glass A.J., Engelbrecht S., Van Zyl G., Preiser W., Petruccione F., Sigal A., Hardie D., Marais G., Hsiao N.Y., Korsman S., Davies M.A., Tyers L., Mudau I., York D., Maslo C., Goedhals D., Abrahams S., Laguda-Akingba O., Alisoltani-Dehkordi A., Godzik A., Wibmer C.K., Sewell B.T., Lourenço J., Alcantara L.C.J., Kosakovsky Pond S.L., Weaver S., Martin D., Lessells R.J., Bhiman J.N., Williamson C., de Oliveira T. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature*. 2021; 592(7854):438–43. DOI: 10.1038/s41586-021-03402-9.
 9. Callaway E. Delta coronavirus variant: scientists brace for impact. *Nature*. 2021; 595(7865):17–8. DOI: 10.1038/d41586-021-01696-3.
 10. Thakur V., Ratho R.K.OMICRON (B.1.1.529): A new SARS-CoV-2 variant of concern mounting worldwide fear. *J. Med. Virol.* 2021. DOI: 10.1002/jmv.27541.
 11. Cascella M., Rajnik M., Aleem A., Dulebohn S.C., Napoli R.D. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19). (Cited 05 Jan 2022). [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776>.
 12. Dudas G., Hong S.L., Potter B.I., Calvignac-Spencer S., Niatou-Singa F.S., Tombolomako T.B., Fuh-Neba T., Vicks U., Ulrich M., Leendertz F.H., Khan K., Huber C., Watts A., Olendraitė I., Snijder J., Wijnant K.N., Bonvin A.M.J.J., Martres P., Behillil S., Ayoub A., Maidadi M.F., Djoms D.M., Godwe C., Butel C., Simaitis A., Gabriellaitė M., Katėnaitė M., Norvilas R., Raugaitė L., Koyaweda G.W., Kandou J.K., Jonikas R., Nasvytienė I., Zemeckienė Z., Gečys D., Tamušauskaitė K., Norkienė M., Vasilūnaitė E., Ziogienė D., Timinskas A., Sukys M., Šarauskas M., Alzbutas G., Aziza A.A., Lusamaki E.K., Cigolo J.M., Mawete F.M., Lofiko E.L., Kingebeni P.M., Tamfum J.M., Belizaire M.R.D., Essomba R.G., Assoumou M.C.O., Mboringong A.B., Dieng A.B., Juozapaitė D., Hosch S., Obama J., Ayekaba M.O., Naumovas D., Pautienius A., Rafai C.D., Vitkauskienė A., Ugenskienė R., Gedvilaitė A., Čereškevičius D., Lesauskaitė V., Žemaitis L., Griškevičius L., Baele G. Emergence and spread of SARS-CoV-2 lineage B.1.620 with variant of concern-like mutations and deletions. *Nat. Commun.* 2021; 12(1):5769. DOI: 10.1038/s41467-021-26055-8.
 13. Leist S.R., Schäfer A., Martinez D.R. Cell and animal models of SARS-CoV-2 pathogenesis and immunity. *Dis. Model. Mech.* 2020; 13(9):dmm046581. DOI: 10.1242/dmm.046581.
 14. Stelzer-Braid S., Walker G.J., Aggarwal A., Isaacs S.R., Yeang M., Naing Z., Ospina Stella A., Turville S.G., Rawlinson W.D. Virus isolation of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) for diagnostic and research purposes. *Pathology*. 2020; 52(7):760–3. DOI: 10.1016/j.pathol.2020.09.012.
 15. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* 1938; 27(3):493–7. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.
 16. Twohig K.A., Nyberg T., Zaidi A., Thelwall S., Sinnathamby M.A., Aliabadi S., Seaman S.R., Harris R.J., Hope R., Lopez-Bernal J., Gallagher E., Charlett A., De Angelis D., Presanis A.M., Dabrera G., COVID-19 Genomics UK (COG-UK) Consortium. Hospital admission and emergency care attendance risk for SARS-CoV-2 delta (B.1.617.2) compared with alpha (B.1.1.7) variants of concern: a cohort study. *Lancet Infect. Dis.* 2022; 22(1):35–42. DOI: 10.1016/S1473-3099(21)00475-8.
 17. Bartolini D., Stabile A.M., Bastianelli S., Giustarini D., Pierucci S., Busti C., Vacca C., Gidari A., Francisci D., Castronari R., Mencacci A., Di Cristina M., Focaia R., Sabbatini S., Rende M., Gioiello A., Cruciani G., Rossi R., Galli F. SARS-CoV-2 infection impairs the metabolism and redox function of cellular glutathione. *Redox Biol.* 2021; 45:102041. DOI: 10.1016/j.redox.2021.102041.
 18. Kumar S., Thambiraja T.S., Karuppanan K., Subramaniam G. Omicron and Delta variant of SARS-CoV-2: A comparative computational study of spike protein. *J. Med. Virol.* 2021; 94(4):1641–9. DOI: 10.1002/jmv.27526.
 19. Davies N.G., Abbott S., Barnard R.C., Jarvis C.I., Kucharski A.J., Munday J.D., Pearson C.A.B., Russell T.W., Tully D.C., Washburne A.D., Wenseleers T., Gimma A., Waites W., Wong K.L.M., van Zandvoort K., Silverman J.D., CMMID COVID-19 Working Group, COVID-19 Genomics UK (COG-UK) Consortium, Diaz-Ordaz K., Keogh R., Eggo R.M., Funk S., Jit M., Atkins K.E., Edmunds W.J. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science*. 2021; 372(6538):eabg3055. DOI: 10.1126/science.abg3055.
 20. Altmann D.M., Boyton R.J., Beale R. Immunity to SARS-CoV-2 variants of concern. *Science*. 2021; 371(6534):1103–4. DOI: 10.1126/science.abg7404. PMID: 33707254.
 21. Ferrareze P.A.G., Franceschi V.B., Mayer A.M., Caldana G.D., Zimmerman R.A., Thompson C.E. E484K as an innovative phylogenetic event for viral evolution: Genomic analysis of the E484K spike mutation in SARS-CoV-2 lineages from Brazil. *Infect. Genet. Evol.* 2021; 93:104941. DOI: 10.1016/j.meegid.2021.104941.
- Authors:**
Zaykovskaya A.V., Gladysheva A.V., Kartashov M.Yu., Taranov O.S., Ovchinnikova A.S., Shipovalov A.V., P'yankov O.V. State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru.
- Об авторах:**
Зайковская А.В., Гладышева А.В., Карташов М.Ю., Таранов О.С., Овчинникова А.С., Шиповалов А.В., Пьянков О.В. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., р.п. Колыцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru.