

## Авторы:

ФИО	Должность
Шиповалов Андрей Владимирович ORCID:0000-0003-1201-8307	Научный сотрудник отдела коллекции микроорганизмов, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Кудров Глеб Александрович ORCID:0000-0002-8251-7040	Младший научный сотрудник отдела коллекции микроорганизмов, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Томилев Алексей Александрович ORCID:0000-0001-5311-9783	Стажёр-исследователь отдела коллекции микроорганизмов, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Боднев Сергей Александрович ORCID:0000-0003-0599-3817	Заведующий лабораторией отдела коллекции микроорганизмов, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Болдырев Никита Дмитриевич ORCID:0000-0001-8854-0287	Стажёр-исследователь отдела коллекции микроорганизмов, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Овчинникова Алёна Сергеевна ORCID:0000-0002-1745-7643	Старший научный сотрудник отдела коллекции микроорганизмов, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Зайковская Анна Владимировна ORCID:0000-0002-0450-5212	Старший научный сотрудник отдела коллекции микроорганизмов, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Таранов Олег Святославович ORCID:0000-0002-6746-8092	Заведующий отдела микроскопических исследований, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Ивлева Елена Константиновна ORCID:0000-0003-1194-7219	Младший научный сотрудник отдела микроскопических исследований, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Пьянков Олег Викторович ORCID:0000-0003-3340-8750	Заведующий отделом коллекции микроорганизмов, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Максютов Ринат Амирович ORCID:0000-0003-2577-0434	Генеральный директор, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

## Контактная информация:

Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора 630559, Новосибирская область, р. п. Кольцово. Телефон: 8 (383) 363-47-10 336-60-10, Факс: 8 (383) 336-74-09 E-mail: [vector@vector.nsc.ru](mailto:vector@vector.nsc.ru)

## Корреспондирующий автор:

Шиповалов Андрей Владимирович

e-mail: [shipovalov\\_av@vector.nsc.ru](mailto:shipovalov_av@vector.nsc.ru);

телефон: +7(383)363-47-00, доб. 22-32

**А.В. Шиповалов, Г.А. Кудров, А.А. Томилов, С.А. Боднев, Н.Д. Болдырев,  
А.С. Овчинникова, А.В. Зайковская, О.С. Таранов, О.В. Пьянков, Р.А. Максюттов**

## **ВОСПРИИМЧИВОСТЬ И ПАТОГЕННОСТЬ ВЫЗЫВАЮЩИХ ОБЕСПОКОЕННОСТЬ ВАРИАНТОВ ВИРУСА SARS-CoV-2 В МЫШИНОЙ МОДЕЛИ.**

*ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»  
Роспотребнадзора, п. Кольцово, Россия*

**Целью** работы явилось изучение восприимчивости мышей разных линий к вновь возникающим вариантам SARS-CoV-2. **Материалы и методы.** В работе использованы вирусологические, молекулярно-биологические и гистологические методы исследований. **Результаты и выводы.** Оценена восприимчивость различных линий мышей к генетическим вариантам вируса SARS-CoV-2. При интраназальном заражении мышей инбредных линий (BALB/c, CBA и C57Bl/6z) и аутбредных мышей CD1 вызывающими беспокойство вариантами (VOC) вируса SARS-CoV-2 в дозе  $2 \times 10^3$  ЦПД<sub>50</sub> показано размножение вируса в легких с максимальными значениями концентраций через 72 часа после заражения. Выявлена восприимчивость мышей линии BALB/c к генетическим вариантам вируса SARS-CoV-2, определена 50% инфицирующая доза при интраназальном заражении (ИД<sub>50</sub>), гистологический анализ показал специфические для COVID 19 поражения тканей легкого инфицированных животных. Наше исследование показывает, что мыши линии BALB/c могут использоваться в качестве модельного животного в скрининговых исследованиях при оценке эффективности терапевтических, вакцинных препаратов и изучении патогенеза, вызванного вариантами VOC вируса SARS-CoV-2: Альфа (B.1.1.7), Бета (B.1.351), Гамма (P.1), Омикрон (B.1.1.529) и им подобными.

**Ключевые слова:** SARS-CoV-2, COVID 19, мышь, 50 % инфицирующая доза, интраназальное заражение, модельное животное, вызывающие беспокойство варианты (VOC).

**A.V. Shipovalov, A.A. Tomilov, G.A. Kudrov, S.A. Bodnev, N.D. Boldyrev,  
A.S. Ovchinnikova, A.V. Zaikovskaya, O.S. Taranov, O.V. Pyankov, R.A. Maksyutov**  
**SUSCEPTIBILITY AND PATHOGENICITY OF SARS-CoV-2 VIRUS VARIANTS OF  
CONCERN IN A MOUSE MOD**

*Federal Budgetary Research Institution State Research Center of Virology and Biotechnology  
“Vector” Rospotrebnadzor, 630559, Novosibirsk region, Koltsovo.*

The aim of the work was to study the susceptibility of mice of different lines to newly emerging variants of SARS-CoV-2. Materials and methods. The work uses virological, molecular biological and histological research methods. Results and conclusions. The susceptibility of various mouse lines to genetic variants of the SARS-CoV-2 virus was evaluated. With intranasal infection of mice of inbred

lines (BALB/c, CBA and C57Bl/6z) and CD1 outbred mice with SARS-CoV-2 virus variants of concern (VOC) at a dose of  $2 \times 10^3$  CPD50, the virus multiplication in the lungs with maximum concentrations 72 hours after infection was shown. The susceptibility of BALB/c mice to genetic variants of the SARS-CoV-2 virus was revealed, a 50% infecting dose was determined for intranasal infection (ID50), histological analysis showed COVID-19-specific lung tissue lesions of infected animals. Our study shows that BALB/c mice can be used as a model animal in screening studies when evaluating the effectiveness of therapeutic, vaccine preparations and studying the pathogenesis caused by VOC variants of the SARS-CoV-2 virus: Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), Omicron (B.1.1.529) and the like.

**Keywords:** SARS-CoV-2, COVID 19, mouse, 50% infecting dose, intranasal infection, model animal, variants of concern (VOC).

## **Введение**

Первые сообщения о новом тяжелом остром респираторном синдроме (SARS) с быстрым ростом числа смертей появились в декабре 2019 года, в городе Ухань, провинция Хубей, Китай. Впоследствии в качестве возбудителя был идентифицирован коронавирус, предварительно названный новым коронавирусом 2019 года (hCoV-19). Секвенирование генома вируса произведено в январе 2020 года [1]. Заболевание, вызванное новым коронавирусом, названо коронавирусной болезнью 2019 года (COVID-19), возбудитель получил название коронавируса 2 связанного с тяжелым острым респираторным синдромом (SARS-CoV-2). По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) на сегодняшний день во всем мире зарегистрировано 340 млн случаев SARS-CoV-2, из них 5,5 млн со смертельным исходом. [2]

С конца 2020 года стали поступать сообщения о появлении новых эпидемически значимых вариантов SARS-CoV-2 в различных точках мира. [3]. В октябре 2020 года впервые идентифицированы варианты SARS-CoV-2 B.1.1.7 (Альфа) в Великобритании и B.1.351 (Бета) в Южной Африке, в январе 2021 года в Бразилии идентифицирован вариант P.1 (Гамма) [4], и вариант B.1.617.2 (Дельта) – в апреле 2021 года в Индии [5]. В данных генетических вариантах были выявлены множественные изменения (делеции и замены) в S-белке по сравнению с референс-вариантом.

Наибольшую значимость имеют мутации в рецептор-связывающем домене (RBD) S-белка. В вариантах Альфа, Бета и Гамма выявлены мутации E484K, N501Y и D614G, увеличивающие сродство RBD к клеточному рецептору, которым является ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2) [6], что подтверждает увеличение трансмиссивности указанных генетических вариантов вируса SARS-CoV-2. В связи с данными мутациями возникла вероятность снижения связывающей активности нейтрализующих антител, приобретенных как после заболевания более ранним вариантом SARS-CoV-2, так и после

вакцинации [7]. В тоже время отсутствие мутаций E484K и N501Y, даже при наличии другой значимой мутации D614G в генетическом варианте Дельта, приводит к снижению инфекционности [5].

Мышиная лабораторная модель является основной для скрининговых исследований эффективности терапевтических средств и вакцинных препаратов против большого числа вирусных инфекций. Первый зарегистрированный вариант В вируса SARS-CoV-2 не инфицирует линии мышей дикого типа и инбредных мышей из-за отсутствия аффинности S-белка и мышиному ACE2[8]. Учитывая повышение патогенности новых вариантов, несущих мутации E484K, N501Y и D614G, а также появления схожей мутации N501Y при длительном пассировании вируса SARS-CoV-2 на мышах [9; 10], не исключена вероятность естественного перехода вируса на мышей. В связи с этим, существует необходимость исследования патогенности новых генетических вариантов вируса SARS-CoV-2 с мутациями E484K, N501Y и D614G на мышах.

Появление и быстрое распространение генетического варианта вируса SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Омикрон), имеющего более 30 мутаций в S-белке, вызвало предположения о возможной смене и/или вовлечении в эпидемический процесс нового хозяина [11]. Данные математического моделирования показали возможность S-белка более активно связываться с мышинным ангиотензинпревращающим рецептором (mACE2)[12]. Наличие мутаций E484A, N501Y и D614G в новом варианте подтверждает ранее выдвинутую гипотезу об усилении восприимчивости мышей к новым вариантам вируса SARS-CoV-2 с данными мутациями [13].

В данной работе мы провели исследование восприимчивости инбредных линий (BALB/c, CBA и C57Bl/6z) и аутбредных мышей CD1 к генетическим вариантам вируса SARS-CoV-2, оценили патогенность различных генетических вариантов для мышей линии BALB/c.

### **Материалы и методы**

*Вирусы.* В работе использовали варианты вируса SARS-CoV-2, относящиеся к вызывающим обеспокоенность (VOC) вариантам, циркулирующим на территории РФ. Данные варианты были получены из Государственной коллекции микроорганизмов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. В качестве референсного использовали генетический вариант В штамм hCoV-19/Australia/VIC01/2020 SARS-CoV-2, полученный из Victorian Infectious Diseases Reference Laboratory (VIDRL), Мельбурн, Австралия. Нуклеотидные последовательности вариантов вируса SARS-CoV-2, использованных в исследовании, депонированы в базе данных GISAID (табл. 1).

Использованные в работе генетические варианты вируса SARS-CoV-2 были выделены в культуре клеток *Vero E6*, аликвоты вируса были заморожены и хранились при температуре -70

°С. Титр стока составлял не менее  $10^6$  ЦПД<sub>50</sub>/мл. В каждом эксперименте использовали новую аликвоту из одного стока.

Эксперименты с вирусом *in vitro* и на животных проводились в вирусологической лаборатории соответствующей уровню биобезопасности - 3 (BSL-3) во ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, имеющем СЭЗ на право проведения работ с особо опасными вирусами. Все эксперименты на животных были одобрены Биоэтическим комитетом Центра и проводились в соответствии с соответствующими национальными и международными руководящими принципами по уходу и гуманному использованию животных.

*Культуры клеток.* В работе использовали линию клеток *Vero E6*, полученную из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Выращивание монослоя клеток *Vero E6* осуществляли в среде DMEM («Gibco», США) с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота («HyClone», США) и комплексного антибиотика («Gibco», США). В качестве поддерживающей среды при культивировании вируса использовали ту же среду, но с добавлением сыворотки в конечной концентрации 2 %.

*Животные.* В экспериментах использовали мышей инбредных линий (BALB/c, CBA и C57Bl/6z) и аутбредных мышей CD1. В работе использовали самцов и самок, с массой тела 18–20 г.

Животные были получены из Питомника лабораторных животных, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Акклиматизация к условиям эксперимента была проведена в течение 7 дней до заражения. После заражения всех животных содержали в садках с HEPA-фильтром системы индивидуального содержания. Во время экспериментов температура в клетке поддерживалась 22° - 24°С, а относительная влажность 40 - 55%. Все животные получали стандартный рацион с достаточным количеством воды согласно ветеринарному законодательству.

*Исследование восприимчивости мышинных линий к SARS-CoV-2.* Использовали 6 групп животных, по 12 мышей линий C57Bl/6z, BALB/c, CBA и CD1 в каждой. Заражение производили интраназальной инокуляцией вируса в объеме 20 мкл, дозой  $3,3 \lg$  ТЦПД<sub>50</sub>, под инъекционным внутримышечным наркозом Zoletil 100 («Virbac», Франция) из расчета 40мг/кг. После инокуляции животные рассаживались по 4 особи одной линии в садки с системой индивидуальной вентиляции. Через 72, 120 и 168 часов после заражения (пз) по 4 особи каждой линии подвергали эвтаназии методом трансцервикальной дислокации, производили вскрытие с забором тканей носовых ходов и легких для определения содержания РНК вируса методом ОТ-ПЦР и для определения концентрации инфекционного вируса методом титрования на культуре клеток *Vero E6*. Из образцов тканей носовых ходов и легких подготавливали 10% гомогенаты на 1мл среды DMEM, после производили отбор аликвот от каждого образца для ПЦР анализа и

титрования живого вируса на культуре клеток. Затем гомогенаты подвергали немедленной заморозке и хранению при температуре - 70 °С.

*Определение патогенности (ИД<sub>50</sub>) генетических вариантов вируса SARS-CoV-2 на мышцах линии BALB/c.* Животные линии BALB/c были разделены на 4 группы по 12 голов из расчета одна группа на одно 10-тикратное разведение вируса. Заражение производили интраназальной инокуляцией вируса в объеме 20 мкл, серийными 10-кратными разведениями рабочих стоков вирусов, под внутримышечным наркозом Zoletil 100 («Virbac», Франция) из расчета 40мг/кг. Группы по 6 животных на каждую дозу заражения помещались в садки с системой индивидуальной вентиляции. Через 72 часа пз все животные подвергались эвтаназии методом трансцервикальной дислокации. для определения вирусной нагрузки в тканях носовой полости и легких, и гистологической оценки.

Для определения титров вируса в легких, 50 мг легочной ткани сначала гомогенизировали с помощью шариковой мельницы (Analytical Jena), затем осветляли путем центрифугирования при 10 000 об/мин с использованием ротора SW28 (Beckman Coulter, High Muscombe, UK), готовили последовательные 10-кратные разведения и титр вируса определяли по методу Рида-Менча в ЦПД<sub>50</sub>/мл.

*Определение РНК вируса SARS-CoV-2 в биологических образцах методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.* Выделение РНК проводили с использованием набора «РИБО-преп» («АмплиСенс», Россия). Синтез кДНК из выделенной РНК проводили с использованием набора реагентов для реакции обратной транскрипции «Реверта-L» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Амплификацию фрагментов кДНК вируса SARS-CoV-2, предварительно синтезированных на матрице РНК вируса SARS-CoV-2 в реакции обратной транскрипции, проводили с использованием набора реагентов «Вектор-ПЦРРВ-COVID19-RG» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия). Результаты исследования интерпретировали в соответствии с инструкцией производителя.

Количество РНК вируса SARS-CoV-2 в пробах определяли через суррогатный показатель St – cycle threshold (порог цикла), определяемый как количество циклов, необходимых для того, что бы флуоресцентный сигнал пересек порог фонового уровня сигнала. Меньшее значение St соответствует большей вирусной нагрузке. При значении St>40, исследуемый образец не содержит вируса.

*Определение инфекционного титра вируса SARS-CoV-2 в биологических образцах на перевиваемой культуре клеток Vero E6.* Инфекционную активность вирусов в стоках, в носовых смывах и в легких инфицированных животных определяли с использованием метода анализа 50% инфекционной дозы для культуры тканей Reed & Muench (ЦПД<sub>50</sub>/мл) (22). Клетки Vero E6 высевали за 24 часа до заражения в 96-луночные планшеты с посевной дозой

1,5 × 10<sup>4</sup> клетки/лунка. В день эксперимента были сделаны последовательные 10-кратные разведений вируса в ПС, и в общей сложности от шести до восьми лунок были заражены каждым разведением вируса. После 72-часовой инкубации клетки фиксировали в 4% раствором параформальдегида с последующим окрашиванием 0,1% кристаллическим фиолетовым. Затем ЦПД50 была рассчитана по формуле:  $\log(\text{ЦПД50}) = \log(d_0) + \log(R)(f + 1)$ . Где  $d_0$  – наибольшее разведение, дающее ЦПД во всех лунках,  $f$  - число, полученное из числа положительных лунок, рассчитанных как среднее арифметическое, а  $R$  - коэффициент разведения.

*Гистологические исследования.* Забор органов от инфицированных животных осуществляли через 120 часов пз. Образцы фиксировали в 10% растворе забуференного формалина для гистологических исследований («БиоВитрум», Россия) в течение 48 ч. Обработку материала проводили по общепринятой методике: последовательное обезвоживание в спиртах возрастающей концентрации, пропитывание в смеси ксилол–парафин и заливка в парафиновые блоки. Парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм готовили с помощью автоматического ротационного микротомы НМ-360 (Германия). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Светооптическое исследование и микрофотосъемку проводили на микроскопе AxioImager Z1 (Zeiss, Германия) с использованием программного пакета AxioVision 4.8.2 (Zeiss, Германия). Оценка распространенности и степени выраженности патологических проявлений инфекции проводили при анализе сканов серийных срезов, полученных на Olympus SlideView VS200 (Olympus, Германия; программный пакет VS200ASW 3.2).

Статистическую обработку результатов проводили программой Statistica v13.0.

## **Результаты**

На первом этапе исследования восприимчивости мышинных линий C57Bl/6z, BALB/c, CBA и CD1 для заражения был использован вариант вируса SARS-CoV-2 Бета, так как имел обе замены E484K и N501Y в RBD, которые, по прогностической оценке, усиливали рецепторную специфичность вируса к мышинному ACE2 рецептору.

Восприимчивость исследуемых линий мышей к варианту Бета оценивали по наличию инфекционного вируса в тканях носовой полости и/или легких инфицированных мышей. Полученные результаты приведены в графическом виде на рис. 1.

Анализ результатов на (рис. 1) показывает, что все используемые в исследовании линии мышей восприимчивы к инфекции, вызываемой вариантом Бета вируса SARS-CoV-2, содержащим замены E484K и N501Y. Наибольшие значения вирусной нагрузки в тканях носовой полости и легких мышей всех линий зафиксировано через 72 часа пз. При сравнении

вирусной нагрузки среди разных линий можно отметить, что у мышей линии BALB/c зарегистрированы наибольшие значения 3,0lgЦПД50/мл и 3,5 lgЦПД50/мл соответственно для носовой полости и легких инфицированных мышей. У других трех линий мышей вирусная нагрузка имеет примерно одинаковые значения в тканях носовой полости и легких. Через 120 часов пз вирусная нагрузка у мышей линий C57Bl/6z и CD1 была на уровне предела обнаружения инфекционного вируса. На этот же период наблюдения вирусная нагрузка у мышей BALB/c и CBA имела средние значения 2,5lg ЦПД50/мл и 1,5lg ЦПД50/мл для носовой полости и 2,5lgЦПД50/мл и 1,5lgЦПД50/мл для легких мышей соответственно. Через 168 часов пз инфекционный вирус не обнаруживался в тканях носовой полости и легких мышей.

Из четырех исследованных на восприимчивость к вирусу SARS-CoV-2 при интраназальном заражении наибольшая вирусная нагрузка в тканях носовой полости и легких мышей была определена для линии BALB/c, что указывает на их относительно повышенную чувствительность к VOC SARS-CoV-2. Поэтому для изучения патогенности нескольких VOC SARS-CoV-2 были использованы мыши этой линии.

Наличие инфекционного вируса SARS-CoV-2 в респираторном тракте мышей всех исследованных линий свидетельствует, что они восприимчивы к COVID 19 подобной инфекции, но наибольшая вирусная нагрузка в мышцах линии BALB/c делает их предпочтительнее, как модель для оценки патогенности исследуемых вариантов вируса.

Для оценки патогенности вируса SARS-CoV-2 мы определили значение инфицирующей дозы ИД<sub>50</sub> для интраназального способа заражения на мышцах линии BALB/c для референс штамма и пяти вариантов, имеющих те или иные замены в S белке.

В табл. 2 приведены доза-зависимые показатели VOC вариантов вируса SARS-CoV-2 для мышей линии BALB/c при интраназальном заражении.

50% инфицирующая доза (ИД<sub>50</sub>) вариантов вируса SARS-CoV-2 для интраназально зараженных мышей BALB/c, определенная по наличию вируса в тканях носовой полости и/или легких мышей (варианты Дельта и референс штамм hCoV-19/Australia/VIC01/2020 (Ухань) не патогенные для мышей BALB/c при интраназальном заражении) указана в таблице 3.

Другим показателем патогенности вируса SARS-CoV-2 является тяжесть поражения тканей легкого инфицированного животного. Для такого исследования, мы использовали мышей линии BALB/c, зараженных вариантом Бета вируса SARS-CoV-2, с последующей гистологической оценкой препаратов легких. Результаты исследования представлены (на рис. 3).

Анализ препаратов легких показывает патологические изменения: дистелектаз, диффузные кровоизлияния, единичные лимфоцитарные инфильтраты. Наиболее выраженные изменения в легких обнаружены в группе мышей, зараженных генетическим вариантом Бета.

При оценке препаратов наблюдалась прямая зависимость площади кровоизлияний от вирусной нагрузки, что подтверждает взаимосвязь данных изменений с патологическим действием генетического варианта Бета на легкие мышей линии BALB/c. Наблюдалась прямая корреляция степени распространённости геморрагического синдрома с инфицирующей дозой вируса. Снижение площади дистелектаза обусловлено увеличением площади геморрагий.

Такой признак воспаления, как клеточная инфильтрация, имел слабую степень выраженности. Клеточная инфильтрация бронха и стенок сосудов находилась в прямой зависимости с дозой заражения. Инфильтрация стенки альвеол имела место, но без видимой взаимосвязи с инфицирующей дозой. В виде единичных находок так же определялись: сладж эритроцитов в сосудах, периваскулярный отек. На рис. 2 представлены примеры патологических изменений, выявленных в ткани лёгкого различных групп разведений.

Наибольшую выраженность в патологии легких мышей имел признак геморрагии, что нетипично для таких животных моделей, как хомяк и приматы, где преимущественно выявлялся признак лимфоцитарной инфильтрации.

В ходе исследования была выявлена чувствительность мышей линии BALB/c к генетическим вариантам вируса SARS-CoV-2, определена 50% инфицирующая доза при интраназальном заражении. Показано, что мышей линии BALB/c можно использовать в качестве животной модели при оценке эффективности терапевтических и вакцинных препаратов, для изучения инфекционного процесса, вызванного генетическими вариантами вируса SARS-CoV-2 Альфа, Бета, Гамма и Омикрон.

## **Обсуждение**

В нашем исследовании четыре генетических варианта SARS-CoV-2 показали патогенность в мышинной модели. Так же было отмечено, что для мышей линии BALB/c исследованные генетические варианты вируса SARS-CoV-2 более патогенны, чем для других линий мышей, использованных в данной работе.

Межвидовой переход без предварительной адаптации новых генетических вариантов вируса SARS-CoV-2, по всей видимости, может быть обусловлен заменами E484K и/или N501Yв вирусном геноме в RBD, которые присутствуют в исследованных нами вариантах Альфа, Бета, Гамма и Омикрон.

А отсутствие этих замен в референс штамме линии В и варианте Дельта 2 линии AY.43 обуславливает невосприимчивость мышей всех изученных в данной работе линий.

Особо следует подчеркнуть, что в работе по математическому моделированию [12] показано, что вариант Омикрон вируса SARS-CoV-2 обладает повышенной способностью

связываться с мышинным ACE2, что подтверждается полученным нами значением  $ID_{50} = 14,1 \pm 1,6$  ЦПД<sub>50</sub> для мышей инбредной линии BALB/c и сопоставимо с аналогичным параметром для сирийских хомячков при интраназальном способе заражения.

Результаты гистологических исследований органов инфицированных мышей выявили сходные с человеческими патоморфологические изменения в легких, что может быть использовано для прогностической оценки патогенеза COVID 19 подобного, вызванного VOC вариантами SARS-CoV-2.

Замены в геноме вызывающих озабоченность вариантов SARS-CoV-2 обуславливают межвидовой переход на новых хозяев без адаптации, что увеличивает их эпидемический потенциал. В этом случае, использование мышинной модели для исследования биологических свойств потенциально новых вариантов с повышенной патогенностью, трансмиссивность является.

Полученные результаты свидетельствуют, что скрининг появляющихся новых генетических вариантов вируса SARS-CoV-2 на мышинной модели без предварительной адаптации в мышинной модели актуален.

Полученные результаты свидетельствуют, что мыши линии BALB/c могут использоваться в качестве модельного животного в скрининговых исследованиях при оценке эффективности терапевтических, вакцинных препаратов и изучении патогенеза, вызванного вариантами VOC вируса SARS-CoV-2: Альфа (B.1.1.7), Бета (B.1.351), Гамма (P.1), Омикрон (B.1.1.529) и им подобными.

С этой точки зрения, поиск новых генетических вариантов способных инфицировать более широкий круг хозяев позволяет заблаговременно оценить их эпидемиологический потенциал и принять адекватные противозидемические мероприятия.

## Список литературы.

1. Wu D., Wu T., Liu Q., Yang Z. The SARS-CoV-2 outbreak: what we know. *Int J Infect Dis.* 2020; 94:44-48. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.03.004
2. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.who.int/ru> (дата обращения: 26.01.2022).
3. Фактологический бюллетень - SARS-CoV-2, вариант, вызывающий обеспокоенность (VOC). - URL: <https://www.euro.who.int/ru/health-topics/health-emergencies/coronavirus-covid-19/publications-and-technical-guidance/2021/factsheet-sars-cov-2-variant-of-concern-voc,-february-2021-produced-by-who-europe> (дата обращения: 26.01.2022).
4. Zhou D., Dejnirattisai W., Supasa P., Liu C., Mentzer A.J., Ginn H.M., Zhao Y., Duyvesteyn H.M.E., Tuekprakhon A., Nutalai R., Wang B., Paesen G.C., Lopez-Camacho C., Slon-Campos J., Hallis B., Coombes N., Bewley K., Charlton S., Walter T.S., Skelly D., Lumley S.F., Dold C., Levin R., Dong T., Pollard A.J., Knight J.C., Crook D., Lambe T., Clutterbuck E., Bibi S., Flaxman A., Bittaye M., Belij-Rammerstorfer S., Gilbert S., James W., Carroll M.W., Klenerman P., Barnes E., Dunachie S.J., Fry E.E., Mongkolsapaya J., Ren J., Stuart D.I., Screaton G.R. Evidence of escape of SARS-CoV-2 variant B.1.351 from natural and vaccine-induced sera. *Cell.* 2021; 184(9):2348-2361. DOI: 10.1016/j.cell.2021.02.037..
5. Investigation of SARS-CoV-2 variants of concern: technical briefings [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.gov.uk/government/publications/investigation-of-novel-sars-cov-2-variant-variant-of-concern-20201201> (дата обращения: 26.01.2022)
6. Supasa P., Zhou D., Dejnirattisai W., Liu C., Mentzer A.J., Ginn H.M., Zhao Y., Duyvesteyn H.M.E., Nutalai R., Tuekprakhon A., Wang B., Paesen G.C., Slon-Campos J., López-Camacho C., Hallis B., Coombes N., Bewley K.R., Charlton S., Walter T.S., Barnes E., Dunachie S.J., Skelly D., Lumley S.F., Baker N., Shaik I., Humphries H.E., Godwin K., Gent N., Sienkiewicz A., Dold C., Levin R., Dong T., Pollard A.J., Knight J.C., Klenerman P., Crook D., Lambe T., Clutterbuck E., Bibi S., Flaxman A., Bittaye M., Belij-Rammerstorfer S., Gilbert S., Hall D.R., Williams M.A., Paterson N.G., James W., Carroll M.W., Fry E.E., Mongkolsapaya J., Ren J., Stuart D.I., Screaton G.R. Reduced neutralization of SARS-CoV-2 B.1.1.7 variant by convalescent and vaccine sera. *Cell.* 2021; 184(8):2201-2211.e7. DOI: 10.1016/j.cell.2021.02.033
7. Li Q., Nie J., Wu J., Zhang L., Ding R., Wang H., Zhang Y., Li T., Liu S., Zhang M., Zhao C., Liu H., Nie L., Qin H., Wang M., Lu Q., Li X., Liu J., Liang H., Shi Y., Shen Y., Xie L., Zhang L., Qu X., Xu W., Huang W., Wang Y. SARS-CoV-2 501Y.V2 variants lack higher infectivity but do have immune escape. *Cell.* 2021; 184(9):2362-2371.e9. DOI: 10.1016/j.cell.2021.02.042.
8. Boudewijns R., Thibaut H.J., Kaptein S.J.F., Li R., Vergote V., Seldeslachts L., De Keyzer C., Bervoets L., Sharma S., Van Weyenbergh J., Liesenborghs L., Ma J., Jansen S., Van Looveren D., Vercruyse T., Jochmans D., Wang X., Martens E., Roose K., De Vlieger D., Schepens B., Van Buyten T., Jacobs S., Liu Y., Martí-Carreras J., Vanmechelen B., Wawina-Bokalanga T., Delang L., Rocha-Pereira J., Coelmont L., Chiu W., Leyssen P., Heylen E., Schols D., Wang L., Close L., Matthijnsens J., Van Ranst M., Compennolle V., Schramm G., Van Laere K., Saelens X., Callewaert N., Opdenakker G., Maes P., Weynand B., Cawthorne C., Velde G.V., Wang Z., Neyts J., Dallmeier K. STAT2 signaling as double-edged sword restricting viral dissemination but driving severe pneumonia in SARS-CoV-2 infected hamsters. *bioRxiv.* 2020; DOI:10.1101/2020.04.23.056838.

9. Gu H., Chen Q., Yang G., He L., Fan H., Deng Y.Q., Wang Y., Teng Y., Zhao Z., Cui Y., Li Y., Li X.F., Li J., Zhang N.N., Yang X., Chen S., Guo Y., Zhao G., Wang X., Luo D.Y., Wang H., Yang X., Li Y., Han G., He Y., Zhou X., Geng S., Sheng X., Jiang S., Sun S., Qin C.F., Zhou Y. Adaptation of SARS-CoV-2 in BALB/c mice for testing vaccine efficacy. *Science*. 2020; 369(6511):1603-1607. DOI: 10.1126/science.abc4730.
10. Rathnasinghe R., Jangra S., Cupic A., Martínez-Romero C., Mulder L.C.F., Kehrer T., Yildiz S., Choi A., Mena I., De Vriese J., Aslam S., Stadlbauer D., Meekins D.A., McDowell C.D., Balaraman V., Richt J.A., De Geest B.G., Miorin L., Krammer F., Simon V., García-Sastre A., Schotsaert M. The N501Y mutation in SARS-CoV-2 spike leads to morbidity in obese and aged mice and is neutralized by convalescent and post-vaccination human sera. *medRxiv [Preprint]*. 2021; 2021.01.19.21249592. DOI: 10.1101/2021.01.19.21249592.
11. Diamond M., Halfmann P., Maemura T., Iwatsuki-Horimoto K., Iida S., Kiso M., Scheaffer S., Darling T., Joshi A., Loeber S., Foster S., Ying B., Whitener B., Floyd K., Ujie M., Nakajima N., Ito M., Wright R., Uraki R., Li R., Sakai Y., Liu Y., Larson D., Osorio J., Hernandez-Ortiz J., ÅEiuoderis K., Florek K., Patel M., Bateman A., Odle A., Wong LY., Wang Z., Edara V.V., Chong Z., Thackray L., Ueki H., Yamayoshi S., Imai M., Perlman S., Webby R., Seder R., Suthar M., Garcia-Sastre A., Schotsaert M., Suzuki T., Boon A., Kawaoka Y., Douek D., Moliva J., Sullivan N., Gagne M., Ransier A., Case J., Jeevan T., Franks J., Fabrizio T., DeBeauchamp J., Kercher L., Seiler P., Singh G., Warang P., Gonzalez-Reiche A.S., Sordillo E., van Bakel H., Simon V. The SARS-CoV-2 B.1.1.529 Omicron virus causes attenuated infection and disease in mice and hamsters. *Res Sq [Preprint]*. 2021; DOI: 10.21203/rs.3.rs-1211792/v1.
12. Wei C., Shan K. J., Wang W., Zhang S., Huan Q., Qian, W. Evidence for a mouse origin of the SARS-CoV-2 Omicron variant. *J Genet Genomics*. 2021; 48(12):1673-8527. DOI: 10.1016/j.jgg.2021.12.003
13. Li Q., Nie J., Wu J., Zhang L., Ding R., Wang H., Zhang Y., Li T., Liu S., Zhang M., Zhao C., Liu H., Nie L., Qin H., Wang M., Lu Q., Li X., Liu J., Liang H., Shi Y., Shen Y., Xie L., Zhang L., Qu X., Xu W., Huang W., Wang Y. SARS-CoV-2 501Y.V2 variants lack higher infectivity but do have immune escape. *Cell*. 2021; 184(9):2362-2371.e9. DOI: 10.1016/j.cell.2021.02.042.

Таблица 1. Перечень используемых штаммов

Table 1. List of strains used

Штамм	GISAID	PANGO	Название	Мутации
hCoV-19/Australia/VIC01/2020	EPI_ISL_406844	B	Ухань	<b>Референс</b>
hCoV-19/Russia/MOS-2512/2020	EPI_ISL_6565012	B.1.1.7	Альфа	<b>N501Y D614G</b>
hCoV-19/Russia/MOS-SAB-1502/2021	EPI_ISL_6492245	B.1.351	Бета	<b>E484K N501Y D614G</b>
hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021	EPI_ISL_6565014	P.1	Гамма	<b>E484K N501Y D614G</b>
hCoV-19/Russia/MOS-2406/2021	EPI_ISL_7338789	B.1.617.2	Дельта	<b>D614G</b>
hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021	EPI_ISL_8920444	B.1.1.529	Омикрон	<b>E484A N501Y D614G</b>

Таблица 2. Патогенность генетических вариантов вируса SARS-CoV-2 для мышей линии BALB/c при интраназальном заражении различными дозами вариантов вируса SARS-CoV-2.

Table 2. Pathogenicity of genetic variants of SARS-CoV-2 virus for BALB/c mice with intranasal infection with different doses of SARS-CoV-2 virus variants.

Генетические варианты		Ухань		Альфа		Бета		Гамма		Дельта		Омикрон	
Титр стока (ЦПД/мл)		5,6 lg		5,9lg		5,6lg		5,4 lg		3,8 lg		3,95 lg	
разведение	параметр	носовые ходы	легкие	носовые ходы	легкие	носовые ходы	легкие	носовые ходы	легкие	носовые ходы	легкие	носовые ходы	легкие
-4	Сt*	40,00±0	40,00±0	40,00±0	40,00±0	40,00±0	40,00±0	40,00±0	40,00±0	40,00±0	40,00±0	40,00±0	40,00±0
	Тинф**	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5
-3	Сt	40,00±0	40,00±0	40,00±0	40,00±0	40,00±0	40,00±0	40,00±0	40,00±0	40,00±0	40,00±0	40,00±0	40,00±0
	Тинф	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5
-2	Сt	40,00±0	40,00±0	40,00±0	40,00±0	30,18±11,5	26,90±9,7	40,00±0	40,00±0	40,00±0	40,00±0	40,00±0	40,00±0
	Тинф	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	1,5±0,0	2,5±0,0	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5
-1	Сt	40,00±0	40,00±0	31,88±6,6	31,41±1,2	22,99±3,3	22,38±1,4	22,23±2,7	30,73±7,4	40,00±0	40,00±0	32,97±2,69	39,67±0,8
	Тинф	≤0,5	≤0,5	1,5±0,0	1,5±0,0	3,0±0,5	3,0±0,5	3,0±0,5	1,5±0,0	≤0,5	≤0,5	1,5±0,0	≤0,5

\*Сt – cycle threshold. При значении Сt>40,00 РНК в пробе отсутствует. \*\*Тинф – Инфекционный титр (lg ЦПД<sub>50</sub>/мл). Предел обнаружения инфекционного вируса в пробах путем титрования на культуре клеток *Vero E6* ≤ 0,5lg ЦПД<sub>50</sub>/мл.

Таблица 3. 50% инфицирующая доза (ИД<sub>50</sub>) вариантов вируса SARS-CoV-2 для интраназально зараженных мышей BALB/c

Table 3. 50% infectious dose (ID<sub>50</sub>) of SARS-CoV-2 virus variants for intranasally infected BALB/c mice

Штамм/вариант SARS-CoV-2	Альфа	Бета	Гамма	Омикрон
50% инфицирующая доза (ИД <sub>50</sub> ), ЦПД <sub>50</sub> , p=0,95	1529 ± 2	199 ± 1,6	47,5 ± 1,8	14,1 ± 1,6

Рис.1. Вирусная нагрузка в гомогенатах тканей носовой полости и легких по результатам титрования титрованием на культуре клеток *Vero E6* соответственно в разные периоды наблюдения после заражения вариантом Бета вируса SARS-CoV-2

Fig.1. Viral load in the homogenates of nasal cavity and lung tissues according to the results of titration by titration on *Vero E6* cell culture, respectively, in different periods of observation after infection with the Beta variant of the SARS-CoV-2 virus

Рисунок 2. Гистологические срезы легких мышей BALB/c, зараженных SARS-CoV-2 вариант Бета. Окраска гематоксилин и эозин. Стрелки указывают: (i) кровоизлияние, (ii) дистелектаз, (iii) инфильтрация стенки альвеол, (iv) инфильтрация стенки сосудов, (v) инфильтрация стенки бронхов. Горизонтальная ось: 10 кратное разведение при заражении. Вертикальная ось: кратность увеличения.

Figure 2. Histological sections of the lungs of BALB/c mice infected with SARS-CoV-2 variant Beta. Staining hematoxylin and eosin. Arrows indicate: (i) hemorrhage, (ii) distelectasis, (iii) infiltration of the alveolar wall, (iv) infiltration of the vascular wall, (v) infiltration of the bronchial wall. Horizontal axis: 10x dilution during infection. Vertical axis: magnification multiplicity.

Authors:

A.V. Shipovalov, A.A. Tomilov, G.A. Kudrov, S.A. Bodnev, N.D. Boldyrev, A.S. Ovchinnikova, A.V. Zaikovskaya, O.S. Taranov, O.V. Pyankov, R.A. Maksyutov

State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: [vector@vector.nsc.ru](mailto:vector@vector.nsc.ru)

Об авторах:

А.В. Шиповалов, Г.А. Кудров, А.А. Томилов, С.А. Боднев, Н.Д. Болдырев, А.С. Овчинникова, А.В. Зайковская, О.С. Таранов, О.В. Пьянков, Р.А. Максютков

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово.

e-mail: [vector@vector.nsc.ru](mailto:vector@vector.nsc.ru)

А.В. Шиповалов -

Г.А. Кудров -

А.А. Томилов -

С.А. Боднев -

Н.Д. Болдырев -

А.С. Овчинникова -

А.В. Зайковская -

О.С. Таранов -

О.В. Пьянков -

Р.А. Максютков -