

Авторы:

ФИО	Должность
Зайковская Анна Владимировна ORCID:0000-0002-0450-5212	Старший научный сотрудник отдела коллекции микроорганизмов, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Гладышева Анастасия Витальевна ORCID: 0000-0002-7396-3954	Младший научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Карташов Михаил Юрьевич ORCID: 0000-0002-7857-6822	Научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Таранов Олег Святославович ORCID:0000-0002-6746-8092	Заведующий отдела микроскопических исследований, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Овчинникова Алёна Сергеевна ORCID:0000-0002-1745-7643	Старший научный сотрудник отдела коллекции микроорганизмов, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Шиповалов Андрей Владимирович ORCID:0000-0003-1201-8307	Научный сотрудник отдела коллекции микроорганизмов, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Пьянков Олег Викторович ORCID:0000-0003-3340-8750	Заведующий отделом коллекции микроорганизмов, 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

Корреспондирующий автор:

Зайковская Анна Владимировна
e-mail: zaykovskaya_av@vector.nsc.ru;
телефон: +7(383)363-47-00, доб. 25-02

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

ИЗОЛЯЦИЯ И ИЗУЧЕНИЕ IN VITRO БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММОВ КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2, ОТНОСЯЩИХСЯ К РАЗЛИЧНЫМ ГЕНЕТИЧЕСКИМ ВАРИАНТАМ

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирского района, Новосибирской
области

Цель. Изучить особенности репродукции штаммов коронавируса SARS-CoV-2 различных генетических линий в культуре клеток Vero E6. **Материалы и методы.** Штаммы коронавируса SARS-CoV-2 были взяты из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ БВ «Вектор» Роспотребнадзора. В работе использовали культуры клеток Vero и Vero E6. Кинетику накопления инфекционного вируса определяли путем титрования образцов культуральной жидкости через 24, 48, 72, 96 часов после инфицирования ($MOI = 1$ до $0,00001$ ТЦД₅₀/клетку). Образование бляшек изучали на культуре клеток Vero E6 под 0,2% агаровым покрытием. Анализ изображения и подсчёт размеров бляшек проводили в программе Adobe Photoshop CS6 Extended 13.0.1.3. **Результаты.** Описана динамика накопления инфекционного вируса в культуральной жидкости в зависимости от множественности инфицирования для штаммов коронавируса SARS-CoV-2, относящихся к разным генетическим линиям. Показаны различия морфологии бляшек для изученных штаммов. Штаммы коронавируса SARS-CoV-2, относящиеся к Alfa и Delta VOC нарабатываются в тирах более $7 \lg$ ТЦД₅₀/100мкл, что превышает значения для других штаммов. Генетический вариант Omicron VOC, имеющий наибольшее количество мутаций, под агаровым покрытием образует самые мелкие бляшки и при низкой множественности инфицирования имеет низкий уровень репродукции. **Выводы.** Штаммы коронавируса SARS-CoV-2, относящиеся к разным генетическим линиям, имеют существенные отличия в скорости репродукции в культуре клеток Vero E6.

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

Корреспондирующий автор: Зайковская Анна Владимировна, тел.: +7 (383) 363 4710, e-mail: zaykovskaya_av@vector.nsc.ru

A.V. Zaykovskaya, A.V. Gladysheva, M. Yu. Kartashov, O.S. Taranov, A.S. Ovchinnikova,
A.V. Shipovalov, O.V. Pyankov

ISOLATION AND IN VITRO STUDY OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF SARS-COV-2 CORONAVIRUS STRAINS RELATED TO VARIOUS GENETIC VARIANTS

Federal Budgetary Research Institution «State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being

FBRI SRC VB «Vector», Rospotrebnadzor

The main goal of research was to study the reproduction features of SARS-CoV-2 coronavirus strains of various genetic lines in Vero E6 cell culture. **Materials and methods.** The SARS-CoV-2 coronavirus strains were taken from the State Collection of Viral Infections and Rickettsiosis of the FBRI SRC VB «Vector» of Rospotrebnadzor. Cell cultures Vero and Vero E6 were used in this research. The kinetics of infectious virus accumulation was determined by titration of culture fluid samples 24, 48, 72, 96 hours after infection (MOI = 1 до 0,00001 TCID₅₀/cell). Plaque formation was studied on Vero E6 cell culture under 0.2% agar coating. Image analysis and plaque size calculation were performed using Adobe Photoshop CS6 Extended 13.0.1.3. **Results and discussion.** The study describes the dynamics of accumulation in the culture fluid of the infectious SARS-CoV-2 virus, related to different genetic lines. The result shows that plaque morphology differs between different strains of the virus. The SARS-CoV-2 coronavirus strains related to Alfa and Delta VOC are produced in titers of more than 7 lg TCD₅₀/100 µl. This is the limit for other strains. The genetic variant of Omicron VOC, which has the highest number of mutations, forms small plaques under agar coating. And at a low multiplicity of infection, the Omicron VOC variant has a low reproduction rate. **Conclusion.** Coronavirus SARS-CoV-2 strains belonging to different genetic lines have significant differences in the rate of reproduction in Vero E6.

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

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

На сегодняшний день в мире зарегистрировано более 340 миллионов случаев заболевания COVID-19, из них 5,5 случаев летальных исходов. В России число случаев, выявленных за сутки, стремительно растет в результате распространения нового генетического варианта Omicron SARS-CoV-2. На 27 января 2022 года количество случаев заболевания превысило 11 миллионов [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].

К настоящему времени идентифицировано множество различных генетических вариантов SARS-CoV-2. Согласно Центру по контролю и профилактике заболеваний (CDC), вариант, ответственный за повышенную трансмиссивность, тяжелое течение заболевания, снижение эффективности лечения и многие другие факторы, вызывающие беспокойство, получил название VOC (Variant of Concern). На данный момент Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) выделяет пять основных вариантов VOC: Alpha VOC (линия B.1.1.7) появился в Великобритании [3-4], Beta VOC (линия B.1.351) в Южной Африке [5], Gamma VOC (линия B.1.1.28.1 или P.1) в Бразилии [6-8], Delta VOC (линия B.1.617.2) в Индии [9], и совсем недавно Omicron VOC (линия B.1.1.529) в Южной Африке [10]. Каждая из генетических линий вариантов VOC имеет ключевые мутации, которые оказывают влияние на биологические свойства вируса SARS-CoV-2 [11].

Многие из мутаций, обнаруженных в VOC, расположены в рецептор связывающем домене (receptor-binding domain, RBD) вирусного белка S [12]. Вариант Alpha VOC (B.1.1.7) включает 17 мутаций в вирусном геноме. Из них восемь мутаций (делеция $\Delta 69-70$, делеция $\Delta 144$, N501Y, A570D, P681H, T716I, S982A, D1118H) находятся в белке S. Вариант Beta VOC (B.1.351) включает девять мутаций (L18F, D80A, D215G, R246I, K417N, E484K, N501Y, D614G и A701V) в белке S, из которых три мутации (K417N, E484K и N501Y) расположены в RBD. Вариант Gamma VOC (B.1.1.28) содержит десять мутаций в белке S (L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, H655Y, T1027I, V1176, K417T, E484K и N501Y), из них три (L18F, K417N, E484K) расположены в RBD. Вариант Delta VOC (B.1.617.2) содержит десять мутаций (T19R, (G142D*), 156del, 157del, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N) в шиповидном белке. И вариант Omicron — это новый сильно мутировавший вариант SARS-CoV-2, появившийся на юге африканского континента 26-го ноября 2021 г. Данные, полученные при секвенировании генома варианта Omicron, продемонстрировали более 30 мутаций в S белке.

Появление современных методов секвенирования позволяет быстро выявлять вновь возникающие генетические линии коронавируса SARS-CoV-2 и картировать мутации. Однако для изучения биологических свойств вируса необходимо

использование вирусологических методов. Клеточные культуры являются наглядной моделью для изучения биологии вирусной инфекции и особенностей взаимодействия вируса с клеткой хозяина *in vitro*. Многие пилотные исследования коронавируса SARS-CoV-2 были проведены на клеточных линиях почки африканской зеленой мартышки: Vero E6 и Vero-CCL81, поскольку они экспрессируют большое количество ACE2 рецептора [13-15]. Возникновение и накопление мутаций в геноме коронавируса ведет к изменению его биологических свойств. Особенности репродукции на культурах клеток являются одной из важных характеристик вирусного штамма.

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

Материалы и методы

Культуры клеток. В работе использовали культуры клеток Vero и Vero E6 (клетки эпителия почки африканской зеленой мартышки) (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Клетки культивировали при 37°C в питательной среде DMEM («Gibco») с L-глутамином, с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Gibco»), Antibiotic-Antimycotic («Gibco») в атмосфере с 5% CO₂.

Вирусы. Исследование проводили с использованием штаммов коронавируса SARS-CoV-2, депонированных в Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, которые были выделены от больных людей на территории РФ. Штаммы вирусов были наработаны на культуре клеток Vero E6 и приготовлены аликвоты, после чего они были помещены на хранение при минус 80 °C. Сведения о происхождении, генетических характеристиках, инфекционных титрах штаммов представлены в таблице 1.

Выделение изолятов вируса. Образцы носоглоточных смывов, положительные при исследовании методом ПЦР на наличие РНК коронавируса SARS-CoV-2, осветляли центрифугированием, фильтровали через фильтрующие насадки (Millex с диаметром пор 0,22 мкм) и высевали на монослой культуры клеток Vero и Vero E6, выращенных в культуральных флаконах площадью поверхности 25 см². Инкубацию инфицированных культур клеток проводили при 37°C в течение 5 суток или до появления ЦПД. Наличие вируса в культуральной жидкости подтверждали в ОТ-ПЦР («Вектор-ПЦРrv-2019-nCoV-RG», Россия).

Определение титра вируса. Культуру клеток выращивали в 96-ти луночном культуральном планшете. После удаления ростовой среды из лунок культурального планшета в них вносили последовательные десятикратные разведения вирусосодержащей жидкости в поддерживающей среде в трех повторах. Планшеты инкубировали в течение 4 суток, результат учитывали визуально по наличию ЦПД после окрашивания раствором генцианвиолета. Для окрашивания клеток 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 мин жидкость из лунок удаляли и планшеты промывали водопроводной водой. Специфическое поражение монослоя культуры клеток в лунке учитывали как ЦПД. Расчет титра вируса проводили по формуле Рида-Менча и выражали в lg ТЦД₅₀/мл [16].

Изучение морфологии бляшек под агаровым покрытием. Монослой культуры клеток выращивали в 24- луночных культуральных планшетах. После удаления из лунок ростовой среды, вносили инфицирующую жидкость при MOI = 0,001 ТЦД₅₀/клетку для каждого штамма вируса, после экспозиции 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) с антибиотиками 100 ЕД/мл (Anti-anti (Gibco)), 5% эмбриональной сыворотки KPC (Gibco), 0,2% агара (бакто-агар, Becton Dickinson and Company USA). Культуральные планшеты инкубировали в течение 4 суток, затем окрашивали 0,2% раствором генцианвиолета.

Кинетика накопления инфекционного вируса в культуральной жидкости в зависимости от множественности инфицирования. Монослой культуры клеток выращивали в 48- луночных культуральных планшетах, инфицировали разведениями каждого вирусного штамма при MOI = с 1 до 0,00001 ТЦД₅₀/клетку в трех повторах. После экспозиции в течение 1 часа, промывали трехкратно, затем добавляли поддерживающую среду (питательная среда DMEM («Gibco») с L-глутамином, с добавлением 2% эмбриональной телячьей сыворотки («Gibco»), Antibiotic-Antimycotic («Gibco»)). Через 24, 48, 72, 96 часов после инфицирования пробы культуральной жидкости из каждой лунки титровали на монослое культуры клеток для определения титра вируса.

Анализ данных. Анализ данных проведен с использованием программы «Microsoft Excel», анализ изображения и подсчёт размеров бляшек проведен с помощью программного пакета Adobe Photoshop CS6 Extended 13.0.1.3.

Результаты и обсуждение

В работе было использовано семь штаммов коронавируса SARS-CoV-2, которые были выделены в разные периоды пандемии и относятся к разным генетическим линиям. Все штаммы характеризуются наличием ключевых мутаций, характерных для генетической линии, к которой они принадлежат. Штамм hCoV-19/Australia/VIC01/2020 (линия В) был любезно предоставлен Mike Catton (Victorian Infectious Diseases Reference Laboratory, Melbourne, Australia) в феврале 2020 г. Этот штамм был использован в качестве прототипного варианта. Штамм hCoV-19/Russia/Omsk202118_1707/2020 относится к генетической линии В 1.1, не является VOC. Штаммы вируса SARS-CoV-2 этой генетической линии вызвали первый подъем заболеваемости коронавирусной инфекцией в России. Штаммы hCoV-19/Russia/MOS-2512/2020 (линии В 1.1.7, Alpha вариант) и hCoV-19/Russia/MOS-SAB-1502/2021 (линии В 1.351, Beta вариант) относятся к VOC и характеризуются высокой трансмиссивностью, повышенным уровнем смертности и распространенностью среди молодых людей [3]. Штамм hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021 (линия В 1.1.28.1, Gamma вариант) характеризуется более высокой трансмиссивностью, чем предыдущие варианты. Штамм hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021 (линии В 1.617.2) относится к варианту Delta, который связан с повышенной тяжестью заболевания и более высоким уровнем госпитализации среди заболевших [17]. Штаммы этой генетической линии были зарегистрированы на территории России с весны 2021 года, с тех пор вариант Delta быстро стал преобладающей линией, благодаря высокой трансмиссивности. Штамм hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021 (линия В.1.1.529, Omicron вариант) появился на территории России недавно, в настоящее время активно распространяется, достоверных сведений об особенностях проявлений инфекции на момент написания статьи пока не было.

Для выделения штаммов использовали две культуры клеток Vero и Vero E6. Практически все штаммы на первом пассаже успешно культивировались на использованных культурах клеток. Однако, при выделении изолята hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021 на культуре клеток Vero на первом пассаже не

было 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 зафиксировано не было. Такого рода избирательный цитопатический эффект 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 коронавирусом [18].

При проведении вирусологических исследований коронавируса SARS-CoV-2 большое значение имеет получение пулов вируса с высокими инфекционными титрами. Для решения этого вопроса был проведен эксперимент по изучению динамики накопления инфекционного вируса в культуральной жидкости в зависимости от множественности инфицирования (Рисунок 1). Анализируя результаты рисунка 1 можно сказать, что все приведенные в исследовании штаммы коронавируса SARS-CoV-2 успешно реплицируются на культуре клеток Vero E6. При большой множественности заражения вирус достаточно быстро начинает репродуцироваться в культуре клеток. Через 24 часа ЦПД визуально не определяется, через 48 часов при высокой множественности ($1 - 0,001$) ЦПД достигает 80-100 %, при этом титры вируса резко возрастают. При 100% повреждении монослоя клеток в дальнейшем вирус начинает терять инфекционность. При множественности заражения $0,0001 - 0,00001$ ЦПД проявляется позже (48 – 72 часа) и характеризуется очаговыми повреждениями монослоя. В данном случае титры вируса достигают максимальных значений к 96 часам. Согласно результатам представленных исследований штаммы hCoV-19/Russia/MOS-2512/2020 и hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021 нарабатываются в тирах более $7 \lg \text{ТЦД}_{50}/100\text{мл}$, что превышает значения для других штаммов. Штамм hCoV-19/Russia/Omsk202118_1707/2020 не имеет мутаций VOC, уровень репликации этого вируса сравнительно низкий. При $\text{MOI} = 0,001$ и ниже, титры вируса в культуральной жидкости появляются 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 штамма hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021 отличается от остальных штаммов: через 96 часов при низкой множественности ($0,0001$ и ниже) титры не поднимаются до максимального значения, а остаются на достаточно низком уровне.

При культивировании коронавируса SARS-CoV-2 под агаровым покрытием он формирует бляшки – специфическое очаговое повреждение монослоя клеток. На основании анализа размера бляшек можно судить о скорости распространения вируса между соседними клетками монослойной культуры, что дает информацию о скорости репликации вируса. На рисунке 2 показаны фотографии бляшек, которые были получены при инфицировании культуры клеток штаммами коронавируса разных генетических линий. Анализируя полученные результаты можно сказать, что штаммы, использованные в исследовании, формируют бляшки разного размера, что подтверждает различие скорости репродукции вирусных вариантов. Наибольший размер бляшек получен для штаммов hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021 и hCoV-19/Russia/MOS-2512/2020, вирус hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021 образует более мелкие бляшки по сравнению с другими штаммами.

Таким образом, мутации имеющиеся у вариантов VOC, вероятно, способствуют более активной репродукции в культуре клеток Vero E6. Показано, что мутация H69del, V70del(69) общая для вариантов Alfa VOC и Omicron VOC, индуцирует более быстрое слияние клеток и образование многоядерных клеток – синцитии. Еще одна мутация P681H(674) может увеличивать расщепление S1/S2 фуриноподобными протеазами и усиливать слияние мембран клеток-хозяев вируса, она есть у вариантов Alfa VOC, Omicron VOC и Delta VOC. Мутация N501Y, присутствующая во всех VOC, кроме Delta, увеличивает аффинность связывания с рецептором ACE2, а в сочетании с Q498R аффинность связывания становится сильнее, таким образом вариант Omicron получает легкий доступ к клетке-хозяина [19-20]. Связывание с рецептором ACE2 также усиливают: замена T478K, которая присутствует у Delta VOC варианта, замена L452R – у Delta VOC и Omicron VOC вариантов и замена E484K – у Beta VOC и Gamma VOC. Более того, варианты Delta VOC, Gamma VOC и Omicron VOC имеют замену K417N, которая была связана со структурными изменениями S белка, усиливающими уклонение от иммунитета [21-22].

Таким образом, результаты представленных исследований свидетельствуют о том, что штаммы коронавируса SARS-CoV-2, относящиеся к разным генетическим линиям, имеют существенные отличия в скорости репродукции в культуре клеток Vero E6, о чем свидетельствуют данные о титрах вируса в образцах культуральной жидкости и о размерах бляшек, образованных под агаровым покрытием. Наличие мутаций вариантов VOC существенно повышает скорость репродукции коронавируса SARS-CoV-2 для всех вариантов кроме Omicron VOC. Данный вариант вируса под

агаровым покрытием образует самые мелкие бляшки и при низкой множественности инфицирования имеет низкий уровень репродукции. Генетический вариант Omicron VOC обладает серьезными изменениями 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.

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

Список литературы

- [1] World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) dashboard. Available at: <https://covid19.who.int/>. Accessed on 24 January 2022.
- [2] Shiliaev N, Lukash T, Palchevska O, Crossman DK, Green TJ, Crowley MR, Frolova EI, 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 Oct 13;95(21):e0135721. doi: 10.1128/JVI.01357-21. Epub 2021 Aug 18. PMID: 34406867; PMCID: PMC8513475
- [3] Challen R, Brooks-Pollock E, Read JM, 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 Mar 9;372:n579. doi: 10.1136/bmj.n579. PMID: 33687922; PMCID: PMC7941603.
- [4] Volz E, Mishra S, Chand M, Barrett JC, Johnson R, Geidelberg L, Hinsley WR, Laydon DJ, Dabrera G, Kwiatkowski DP. COVID-19 Genomics UK (COG-UK) consortium, Flaxman S, Ratmann O, Bhatt S, Hopkins S, Gandy A, Rambaut A, Ferguson NM. Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Nature*. 2021 May;593(7858):266-269. doi: 10.1038/s41586-021-03470-x. Epub 2021 Mar 25. PMID: 33767447.
- [5] Yadav PD, Sarkale P, Razdan A, Gupta N, Nyayanit DA, Sahay RR, Potdar V, Patil DY, Baradkar S, Kumar A, Aggarwal N, Shete AM, Kaur H, Mohandas S. Isolation and characterization of SARS-CoV-2 Beta variant from UAE travelers. *J Infect Public Health*. 2021 Dec 24;15(2):182-186. doi: 10.1016/j.jiph.2021.12.011. Epub ahead of print. PMID: 34974274; PMCID: PMC8704724.
- [6] Campbell F, Archer B, Laurenson-Schafer H, Jinnai Y, Konings F, Batra N, Pavlin B, Vandemaele K, Van Kerkhove MD, 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 Jun;26(24):2100509. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.24.2100509. PMID: 34142653; PMCID: PMC8212592.

[7] Faria NR, Mellan TA, Whittaker C, Claro IM, Candido DDS, Mishra S, Crispim MAE, Sales FCS, Hawryluk I, McCrone JT, Hulswit RJG, Franco LAM, Ramundo MS, de Jesus JG, Andrade PS, Coletti TM, Ferreira GM, Silva CAM, Manuli ER, Pereira RHM, Peixoto PS. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science.* 2021 May 21;372(6544):815-821. doi: 10.1126/science.abh2644. Epub 2021 Apr 14. PMID: 33853970; PMCID: PMC8139423.

[8] Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, Iranzadeh A, Fonseca V, Giandhari J, Doolabh D, Pillay S, San EJ, Msomi N, Mlisana K, von Gottberg A, Walaza S, Allam M, Ismail A, Mohale T, Glass AJ, Engelbrecht S, Van Zyl G, Preiser W. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature.* 2021 Apr;592(7854):438-443. doi: 10.1038/s41586-021-03402-9. Epub 2021 Mar 9. PMID: 33690265.

[9] Callaway E. Delta coronavirus variant: scientists brace for impact. *Nature.* 2021 Jul;595(7865):17-18. doi: 10.1038/d41586-021-01696-3. PMID: 34158664.

[10] Thakur V, Ratho RK. OMICRON (B.1.1.529): A new SARS-CoV-2 variant of concern mounting worldwide fear. *J Med Virol.* 2021 Dec 22. doi: 10.1002/jmv.27541. Epub ahead of print. PMID: 34936120.

[11] Cascella M, Rajnik M, Aleem A, et al. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19) [Updated 2022 Jan 5]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776>

[12] Dudas G, Hong SL, Potter BI, Calvignac-Spencer S, Niatou-Singa FS, Tombolomako TB, Fuh-Neba T, Vickos U, Ulrich M, Leendertz FH, Khan K, Huber C, Watts A, Olendraité I, Snijder J, Wijnant KN. Emergence and spread of SARS-CoV-2 lineage B.1.620 with variant of concern-like mutations and deletions. *Nat Commun.* 2021 Oct 1;12(1):5769. doi: 10.1038/s41467-021-26055-8. PMID: 34599175; PMCID: PMC8486757.

[13]S. R. Leist, A. Schäfer, and D. R. Martinez, “Cell and animal models of SARS-CoV-2 pathogenesis and immunity,” *Disease Models & Mechanisms*, vol. 13, no. 9, Sep. 2020, doi: 10.1242/dmm.046581.

[14]Leist SR, Schäfer A, Martinez DR. Cell and animal models of SARS-CoV-2 pathogenesis and immunity. *Dis Model Mech.* 2020 Sep 1;13(9):dmm046581. doi: 10.1242/dmm.046581. PMID: 32887790; PMCID: PMC7490513.

- [15]Stelzer-Braid S, Walker GJ, Aggarwal A, Isaacs SR, Yeang M, Naing Z, Ospina Stella A, Turville SG, Rawlinson WD. Virus isolation of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) for diagnostic and research purposes. *Pathology*. 2020 Dec;52(7):760-763. doi: 10.1016/j.pathol.2020.09.012. Epub 2020 Oct 8. PMID: 33131800; PMCID: PMC7543926.
- [16]Reed, Lowell Jacob, and Hugo Muench, "A simple method of estimating fifty per cent endpoints", *American journal of epidemiology*, vol. 27, no.3, pp. 493-497, 1938.
- [17]Twohig KA, Nyberg T, Zaidi A, Thelwall S, Sinnathamby MA, Aliabadi S, Seaman SR, Harris RJ, Hope R, Lopez-Bernal J, Gallagher E, Charlett A, De Angelis D, Presanis AM, 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 Jan;22(1):35-42. doi: 10.1016/S1473-3099(21)00475-8. Epub 2021 Aug 27. PMID: 34461056; PMCID: PMC8397301.
- [18]Bartolini D, Stabile AM, 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-CoV2 infection impairs the metabolism and redox function of cellular glutathione. *Redox Biol*. 2021 Sep;45:102041. doi: 10.1016/j.redox.2021.102041. Epub 2021 Jun 10. PMID: 34146958; PMCID: PMC8190457.
- [19]Kumar S, Thambiraja TS, Karuppanan K, Subramaniam G. Omicron and Delta variant of SARS-CoV-2: A comparative computational study of spike protein. *J Med Virol*. 2021 Dec 15. doi: 10.1002/jmv.27526. Epub ahead of print. PMID: 34914115.
- [20]Davies NG, Abbott S, Barnard RC, Jarvis CI, Kucharski AJ, Munday JD, Pearson CAB, Russell TW, Tully DC, Washburne AD, Wenseleers T, Gimma A, Waites W, Wong KLM, van Zandvoort K, Silverman JD; CMMID COVID-19 Working Group; COVID-19 Genomics UK (COG-UK) Consortium, Diaz-Ordaz K, Keogh R, Eggo RM, Funk S, Jit M, Atkins KE, Edmunds WJ. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science*. 2021 Apr 9;372(6538):eabg3055. doi: 10.1126/science.abg3055. Epub 2021 Mar 3. PMID: 33658326; PMCID: PMC8128288.
- [21]Altmann DM, Boyton RJ, Beale R. Immunity to SARS-CoV-2 variants of concern. *Science*. 2021 Mar 12;371(6534):1103-1104. doi: 10.1126/science.abg7404. PMID: 33707254.
- [22]Ferrareze PAG, Franceschi VB, Mayer AM, Caldana GD, Zimmerman RA, Thompson CE. 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 Sep;93:104941. doi: 10.1016/j.meegid.2021.104941. Epub 2021 May 25. PMID: 34044192; PMCID: PMC8143912.

Authors:

A.V. Zaykovskaya, A.V. Gladysheva, M. Yu. Kartashov, O.S. Taranov, A.S. Ovchinnikova, A.V. Shipovalov, O.V. Pyankov

State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector”. Kol’tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Об авторах:

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

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

e-mail: vector@vector.nsc.ru

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

Таблица 1. Информация о штаммах коронавируса SARS-CoV-2, использованных в эксперименте

Table 1. Information about SARS-CoV-2 coronavirus strains described in the experiment

Наименование штамма (GISAID ID)	Происхождение штамма, дата выделения	Обозначение штамма согласно ВОЗ (страна происхождения)	Генетическая линия	Титр (lg ТЦД ₅₀ /ml) ±m				
				1 п. ас. са. ж.	2 п. ас. са. ж.	3 п. ас. са. ж.	4 п. ас. са. ж.	5 п. ас. са. ж.
hCoV-19/ Australia/ VIC01/2020 (EPI_ISL_406844)	-	—	B	н. д.	н. д.	6, 0 ± 0, 2 9	7, 0 ± 0, 2 5	7, 5 ± 0, 4 7 *
hCoV-19/ Russia/ Omsk2021 18_1707/2020 (EPI_ISL_1242008)	Омск, июль 2020	—	B1.1	6.0 ± 0, 2 5	6.2 ± 0, 3 8	5, 5 ± 0, 2 5 *		
hCoV-19/ Russia/ MOS-2512/2020 (EPI_ISL_6565012)	Москва, декабрь 2020	альфа (Великобритания)	B1.1.7	6.5 ± 0, 0	6.7 ± 0, 2 5	6.7 ± 0, 2 5	7, 2 ± 0, 3 8 *	
hCoV-19/ Russia/ MOS-SAB-1502/2021 (EPI_ISL_6492245)	Москва, февраль 2021	бета (Южная Африка)	B1.351	3.5 ± 0, 3 5	5.5 ± 0, 0	6.7 ± 0, 3 8	6, 3 ± 0, 1 7 *	
hCoV-19/ Russia/ SA-17620-	Якутск, май	гамма (Браз	P1	4.7 5	5.5 ±	6, 3 ±		

080521/2021 (EPI_ISL_6565014)	2021	илия)		± 0, 1 7	0, 3 8	0.17*		
hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021 (EPI_ISL_7338814)	Псков, апрель 2021	дельта (Индия)	B.1.617.2	6.75 ± 0,25	6.5 ± 0,00	6.75 ± 0,25	7,0 ± 0.47*	
hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021 (EPI_ISL_8920444)	Москва, декабрь 2021	омикрон (Южная Африка)	B.1.1.529	-	3,5 ± 0,25	6,0 ± 0,17*		

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

Figure 1. Kinetics of SARS-CoV-2 virus reproduction in Vero E6 cells depending on the multiplicity of infection.

Рисунок 2. Образование бляшек на монослое культуры клеток Vero E6 под агаровым покрытием на 4 сутки после инфицирования. Над каждым рисунком указано среднее значение площади бляшек \pm 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*.

Figure 2. Plaque formation on an agar-coated Vero E6 cell culture monolayer at day 4 post-infection. The mean plaque area (\pm) standard deviation is indicated under each figure (A-G).