

Д.В. Антонец, М.Е. Старчевская, Н.П. Колосова, И.М. Сулопаров, А.В. Даниленко, С.А. Боднев, А.Н. Швалов, Т.В. Трегубчак, А.Б. Рыжиков, О.В. Пьянков, Р.А. Максютов

Предварительный анализ генетической изменчивости изолятов вируса SARS-CoV-2, относящихся к варианту Омикрон, циркулирующих на территории Российской Федерации

1 – ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «ВЕКТОР» Роспотребнадзора, 630559, Новосибирская область, р. п. Кольцово.

Резюме

С момента начала пандемии COVID-19 в 2020 году в России наблюдалось пять волн циркуляции SARS-CoV-2. Наблюдалась быстрая эволюция SARS-CoV-2, которая привела к появлению новых вариантов вируса, которые последовательно сменялись более адаптированным вариантом. Вариант Омикрон, выявленный в ноябре 2021 года, быстро распространяется в мире и в России и вытесняет предыдущий вариант Дельта. **Целью** данного исследования было описание результатов мониторинга и проведение сравнительной генетической характеристики изолятов варианта Омикрон вируса SARS-CoV-2, выделенных в России и секвенированных во ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора. **Материалы и методы:** в качестве материала для исследования использовали мазки из рото- и носоглотки, собранные Центрами Гигиены и Эпидемиологии Роспотребнадзора. Секвенирование образцов с использованием Illumina Miseq. Биоинформатический анализ геномных данных проводился с помощью ряда программ, таких как FastQC (v.0.11.9), MAFFT (v.7.475), IQ-TREE, Pangolin (v.3.17), Minimap2 (v.2.17-r941), SnpEff (v.5.0e). **Результаты и выводы:** В работе было отсеквенировано и проанализировано 324 изолята варианта Омикрон вируса SARS-CoV-2, выделенных в России в период с 13.12.2021 по 17.01.2022. Выделенные изоляты имели большинство основных характерных мутаций варианта Омикрон, включая 32 мутации в S-белке, которые могут быть ассоциированы с повышенной трансмиссивностью, уклонением от иммунного ответа и изменением тропизма и патогенности. Изоляты варианта Омикрон, выявленные в России, по основным генетическим маркерам сходны со штаммами, циркулирующими в мире, для которых было показано преимущество в заражении по сравнению с вариантом Дельта, снижение эффективности вакцин, но при этом, возможно, менее тяжелое течение заболевания. Вариант Омикрон на данное время считается опасным патогеном и необходимые меры предосторожности, профилактики и лечения являются актуальными на данном этапе пандемии.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, вариант Омикрон, мониторинг, генетическая изменчивость, мутации

Введение/Цель

Коронавирусная инфекция SARS-CoV-2, впервые выявленная в конце 2019 года в городе Ухань в Китае [1], быстро распространилась на глобальном уровне и это распространение SARS-CoV-2 было признано ВОЗ пандемией в марте 2020 года [2]. В настоящее время зарегистрировано более 352 миллионов случаев заболевания COVID-19 во всем мире [3]. В России SARS-CoV-2 был выявлен в начале 2020 года от завезенных случаев (в январе и марте) и к маю 2020 стал распространяться по всей стране [4]. На начало 2022 года с начала пандемии в России зарегистрировано больше 11 миллионов случаев заболевания COVID-19 [3]. В циркулирующих изолятах вируса SARS-CoV-2 была продемонстрирована относительно высокая изменчивость генома, при этом большинство функционально значимых мутаций, приводящих к существенным изменениям свойств вируса было отмечено в S-белке, который является высоко иммуногенным и определяющим антигенные свойства вируса [5].

С момента появления первых вариантов коронавируса SARS-CoV-2 в человеческой популяции, вызвавшего масштабную эпидемию в материковом Китае, переросшую затем в глобальную пандемию по всему миру, возник ряд мутантных вариантов, вызвавших несколько пандемических волн. Эти варианты характеризовались определенными генетическими изменениями, среди которых, в течении пандемии ВОЗ было отмечено пять основных VOC (варианты, вызывающие опасения) SARS-CoV-2: Альфа штамм (B.1.1.7), Бета (B.1.351), Гамма (P.1), Дельта (B.1.617.2) и доминирующий в настоящее время Омикрон (B.1.1.529) [6]. Три варианта из этих пяти широко распространились по всему миру - сначала вариант Альфа (B.1.1.7), который появился в циркуляции с сентября 2020 года [6, 7], затем Дельта (B.1.617.2), который был признан VOC в мае 2021 года [6] и Омикрон (B.1.1.529), который был выявлен в ноябре 2021 года в Южной Африке [6, 8] и продолжает вытеснять вариант Дельта SARS-CoV-2 из циркуляции, достигая глобального доминирования [9, 10].

Вариант Альфа (линия B.1.1.7) впервые был выявлен в Англии, он быстро распространился по всему миру и имел относительно высокую трансмиссивность по данным эпидемиологии [7]. Вариант Дельта (B.1.617.2), вытеснивший вариант Альфа с середины 2021 г., имел еще более высокую трансмиссивность, более эффективное расщепление белка S фуриновой протеазой и отклонение от иммунного ответа [11]. Вариант Омикрон (B.1.1.529), также как вариант Альфа, происходит от генетической линии B.1.1. Вариант Омикрон представляет собой наиболее генетически удаленный вариант из всех исследованных штаммов SARS-CoV-2 на основе анализа S белка. Штаммы варианта Омикрон имеют большое количество (30 и более) мутаций в S-белке по сравнению с начальным референсным штаммом Wuhan-Hu-1, из них 15 аминокислотных замен в рецептор связывающем домене (RBD) в участках, ассоциированных с иммунным ответом. Также вариант омикрон имеет две мутации в сайте расщепления фурином, которые могут повысить эффективность

расщепления. Мутации присутствующие в Омикрон могут быть ассоциированы с более высокой трансмиссивностью, измененным связыванием с рецепторами и с уклонением от иммунного ответа [8, 12].

Высокая относительная трансмиссивность варианта Омикрон наблюдалась по быстрому распространению и вытеснению Дельта варианта в Южной Африке и других странах. По эпидемиологическим оценкам и моделированию предварительно показано, что трансмиссивность варианта Омикрон существенно выше, чем варианта Дельта (приблизительно в 3-5 раз) [13, 14]. Уклонение от иммунного ответа возможно внесло существенную роль в повышенную трансмиссивность варианта Омикрон по сравнению с вариантом Дельта так, как на животных было показано, что Омикрон уступает варианту Дельта в условиях отсутствия вирус-нейтрализующих антител, но демонстрирует значительное преимущество в присутствии нейтрализующих антител к варианту Дельта, которые не эффективны против варианта Омикрон [12].

Исследования на культурах клеток показывают, что вариант Омикрон обладает измененным тропизмом по сравнению с Дельта вариантом. На культуре клеток назального эпителия репликация штаммов вариантов Омикрона и Дельта была сходной, но в клетках легких и желудка Омикрон реплицировался значительно хуже. Также было снижено образование синцитиев (слияния клеток) при заражении штаммом варианта Омикрон. Эти изменения могут быть ассоциированы со сниженной патогенностью *in vivo* и более легким течением заболевания по сравнению с Дельта штаммом, которое наблюдается по предварительным данным [8, 12, 14].

Ряд исследований показал, снижение эффективности широко используемых вакцин против варианта Омикрон по сравнению с вариантом Дельта или предыдущими штаммами. При этом в реакции нейтрализации наблюдалось снижение эффективности в широких пределах от снижения в 2-4 раза до полного отсутствия нейтрализации [8, 15]. Эти данные согласуются с быстрым распространением штамма Омикрон и ростом заболеваемости в странах и регионах с высоким процентов вакцинированного населения. Однако ожидается, что вакцинопрофилактика может значительно снизить тяжесть заболевания [8, 13].

С целью изучения генетической изменчивости вируса SARS-CoV-2, циркулирующего на территории Российской Федерации, Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) с июня 2020 года организован регулярный сбор биологического материала из всех регионов Российской Федерации. С февраля 2021 года на территории Российской Федерации, был утвержден список из 18 научно-исследовательских учреждений, проводящих секвенирование, организован широкомасштабный сбор биологического материала по всем субъектам Российской Федерации. Специалистами ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора был разработан облачный сервис – российская платформа агрегации информации о геномах вирусов

(VGARus – Virus Genome Aggregator of Russia; <https://genome.crie.ru/>), предназначенный для интеграции и анализа данных мониторинга генетической изменчивости SARS-CoV-2.

По состоянию на 28.01.2022 г. на территории Российской Федерации секвенировано и депонировано в базе данных VGARus 44435 полногеномных последовательностей SARS-CoV-2 и 32355 последовательностей фрагментов S белка.

С середины декабря 2021 г. на территории Российской Федерации широкое распространение получили вызывающие беспокойство варианты Дельта (линия AY.122) и Омикрон (линия BA.1). Согласно данным полногеномного секвенирования доля варианта Дельта в ноябре и декабре 2021 г. составляла свыше 90%. На конец января вариант Омикрон стал доминирующим на территории Российской Федерации. По данным полногеномного секвенирования его доля составляла свыше 87%, по данным фрагментного секвенирования – свыше 65%. Доля варианта Дельта сократилась по данным полногеномного секвенирования до 9,6%, по данным фрагментного секвенирования – до 28,5%. В последнее время по данным GISAID в мире происходит рост распространенности генетической линии BA.2 варианта Омикрон. По данным VGARus в России также наметилась тенденция к увеличению доли линии BA.2.

Целью данного исследования было описание результатов мониторинга и проведение сравнительной генетической характеристики изолятов вируса SARS-CoV-2, принадлежащих к варианту Омикрон, выделенных в России и секвенированных ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора с момента появления в декабре 2021 года.

Материалы и методы

Образцы для исследования. Образцы в виде носо- и ротоглоточных мазков получали из лабораторий ЦГиЭ регионов Российской Федерации. Исследование одобрено Этическим Комитетом IRB 00001360 ФБУН ГНЦ Вирусологии и Биотехнологии «Вектор» (<http://www.vector.nsc.ru/eticheskij-komitet/>). Мазки собирали в транспортную среду VTM или аналог, содержащий глицерин и антибиотики-антимикотики. Критерием отправки на исследование служил условный показатель порогового цикла (Ct) не более 25, полученный с помощью ПЦР-тест-систем, зарегистрированных в России как медицинское изделие в установленном порядке.

Пробоподготовка и секвенирование. Тотальную РНК выделяли с помощью набора для выделения ДНК/РНК из биологического материала «РИБО-преп» (ЦНИИЭ, Россия). Экстрагированную РНК незамедлительно использовали для получения тотальной кДНК с использованием набора LunaScript RT SuperMix Kit (New England Biolabs, Великобритания). Полногеномное секвенирование осуществляли по протоколу ARTIC v3 (COVID-19 ARTIC v3 Illumina library construction and sequencing protocol V.5) с двумя пулами олигонуклеотидных праймеров, покрывающими весь геном SARS-CoV-2. Для проведения амплификации

использовали набор реагентов Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs, Великобритания). Полученные фрагменты двухцепочечной ДНК очищали от неизрасходованных компонентов и продуктов реакции с помощью AMPure beads (Beckman Coulter, США), измеряли концентрацию нуклеиновых кислот с помощью Qubit 3.0 с применением набора реагентов Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США) и затем использовали для подготовки библиотек NGS. Для подготовки библиотек использовали метод лигирования Y-образных адаптеров (Illumina). Секвенирование проводили на платформе MiSeq (Illumina) с использованием набора для секвенирования MiSeq Reagent Kit v2 (500-cycles) (Illumina, США).

Биоинформатический анализ. Проверка качества проводилась с помощью программы FastQC (v. 0.11.9) (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), удаление прочтений низкого качества, удаление адаптеров, тримминг проводились с помощью Cutadapt (v.2.8) [16a]. Выравнивание прочтений на референс проводилось с помощью BWA-MEM (v. 0.7.17) [17a]. Обработка и анализ файлов SAM/BAM проводилась с помощью Samtools (v. 1.9) [18a]. Для извлечения консенсусной последовательности из BAM файлов использовалась программа iVar (v. 1.1; <https://github.com/andersen-lab/ivar/>) [19a]. В качестве референсной была использована полногеномная последовательность NC_045512.2 вируса SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1). Полученные последовательности были депонированы в базе данных российской платформы агрегации информации о геномах вирусов (VGARus - Virus Genome Aggregator of Russia; <https://genome.crie.ru/>), разработанной и поддерживаемой ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей геномов проводилось с помощью программы MAFFT (v. 7.475) [20a]. Филогенетический анализ последовательностей геномов проводился с помощью метода максимального правдоподобия с использованием модели GTR. Использовалось программное обеспечение IQ-TREE (v.2.0.3) [21a]. Для определения генетических линий использовалось программное обеспечение Pangolin (v.3.17) [22a].

Идентификация мутаций относительно референсной последовательности проводилась с использованием программ Minimap2 (v.2.17-r941) [23a], bcftools (v.1.11-35-g8a744dd) [19a] и freebayes (v.0.9.21) [24a]. Аннотация мутаций проводилась с использованием программы SnpEff (v.5.0e) [25a]. В качестве референсной была использована полногеномная последовательность NC_045512.2 вируса SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1). Дополнительная информация для аннотации функциональных районов вирусных белков была взята из UniProt (последовательности с номерами P0DTC1, P0DTC2, P0DTC3, P0DTC4, P0DTC5, P0DTC6, P0DTC7, P0DTC8, P0DTC9, P0DTD1, P0DTD2, P0DTD3, P0DTD8, P0DTF1, P0DTG0 и P0DTG1). Визуализация деревьев выполнена с помощью библиотеки ape (v.5.6-1) [26a] для R (v.4.0.4; <https://www.R-project.org/>). Чтение и анализ файлов в формате VCF и

GFF были реализованы с помощью оригинальных скриптов, написанных на языке программирования Python (v.3.8.12) с использованием библиотеки scikit-allel (v.1.3.3.) [27a].

Результаты и обсуждение

В России с начала пандемии (с начала 2020 года) в течении двух лет было отмечено пять волн циркуляции SARS-CoV-2. Среди VOC, Альфа вариант присутствовал в циркуляции в России во время второй волны коронавируса (с пиком в конце 2020 года), во время третьей волны (с пиком в июле 2021 года). С мая 2021 года и во время четвертой волны (с пиком в ноябре 2021) в России преимущественно циркулировал вариант Дельта. Первые случаи инфекции, вызванной вариантом Омикрон, были выявлены в России в декабре 2021 года. Текущая пятая волна коронавируса в России, которая началась в середине января 2022 включает совместную циркуляцию вариантов Дельта и Омикрон с ожидаемым увеличением доли варианта Омикрон (B.1.1.529) в циркуляции до полного доминирования. На рис. 1 представлена динамика смены доминирующих вариантов SARS-CoV-2 в России с сентября 2020 г. по январь 2022 г. по данным ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора. На конец января вариант Омикрон стал доминирующим на территории Российской Федерации.

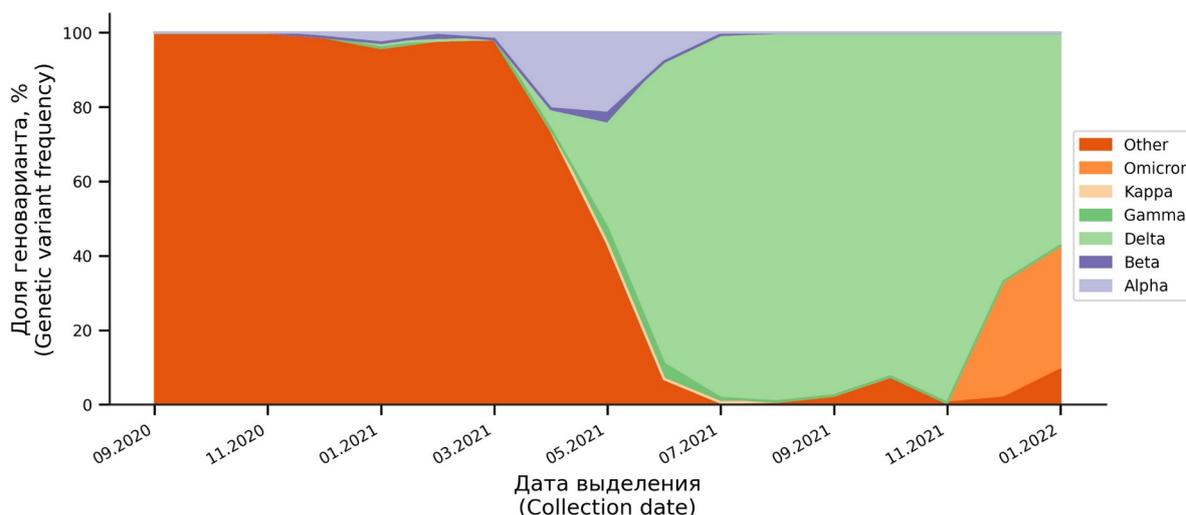


Рис. 1. Смена доминирующих генетических вариантов среди изолятов SARS-CoV-2. Используются данные об изолятах выделенных на территории Российской Федерации и секвенированных ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Приведены данные по ежемесячной динамике для вариантов, вызывающих беспокойство (Альфа, Бета, Гамма, Дельта и Омикрон), варианта Каппа и всех остальных (N = 3559; для 65 субъектов Российской Федерации).

С июля 2020 г. ГНЦ ВБ “Вектор” было секвенировано более 3559 полногеномных последовательностей SARS-CoV-2, выделенных из биологических образцов, собранных в 65 субъектах Российской Федерации. Генетический материал нового варианта коронавируса SARS-CoV-2, получившего название Омикрон, на территории Российской Федерации был

впервые выделен из носоглоточных мазков, взятых 03.12.2021 г. у путешественников, вернувшихся из ЮАР. На момент подготовки данного сообщения (на 26.01.2022 г.) ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора было секвенировано 324 полногеномных последовательности, относящихся к варианту Омикрон SARS-CoV-2, полученных из 24 субъектов Российской Федерации. Наибольшее количество образцов, содержащих генетический материал варианта Омикрон, было получено из Москвы, Санкт-Петербурга и Свердловской области.

В результате анализа полученных полногеномных последовательностей, отнесенных к варианту Омикрон, с помощью программы freebayes было обнаружено 431 отличие относительно референсной последовательности SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 (NC_045512.2). Из них 401 SNP, 6 MNP и 24 делеции/инсерции. Выявлено 300 транзиций и 94 трансверсии, отношение транзиций и трансверсий составило 3,19. Большинство мутаций было обнаружено в составе гена, кодирующего полипротеин ORF1ab (260 мутаций), большая часть из которых являются миссенс-мутациями, приводящими к изменению аминокислотных остатков (142). В составе гена, кодирующего белок S, было обнаружено 88 мутаций, большая часть из которых также приводят к замене аминокислотных остатков (55). Распределение обнаруженных мутаций по генам и по типам указано в табл. 1.

OPT	Тип мутации	К-во	Частота	
			Макс.	Средн.
ORF1ab	делеции	3	0,932	0,586
	сдвиг рамки	3	0,003	0,003
	миссенс-мутации	142	0,994	0,058
	синонимичные	105	0,985	0,047
	5'UTR	7	0,972	0,170
	Общее к-во	260		
S	делеции	5	0,957	0,360
	инсерции	2	0,809	0,809
	3'UTR	8	0,028	0,022
	сдвиг рамки	2	0,957	0,480
	миссенс-мутации	55	1,000	0,470
	синонимичные	16	0,969	0,070
	Общее к-во	88		
ORF3a	делеции	2	0,009	0,006
	сдвиг рамки	1	0,009	0,009
	миссенс-мутации	14	0,985	0,078
	нонсенс-мутации	1	0,003	0,003
	синонимичные	8	0,985	0,126
	потеря стартового кодона	1	0,003	0,003
	Общее к-во	27		
E	миссенс-мутации	2	0,994	0,498
	Общее к-во	2		
M	миссенс-мутации	6	0,975	0,443
	синонимичные	3	0,003	0,003
	5'UTR	2	0,019	0,011
	Общее к-во	11		
ORF6	миссенс-мутации	1	0,019	0,019

	синонимичные	4	0,997	0,256
	Общее к-во	5		
ORF7a	синонимичные	1	0,009	0,009
	5'UTR	1	0,003	0,003
	Общее к-во	2		
ORF7b	миссенс-мутации	2	0,059	0,031
	синонимичные	1	0,972	0,972
	Общее к-во	3		
ORF8	миссенс-мутации	2	0,003	0,003
	синонимичные	4	0,006	0,004
	Общее к-во	6		
N	делеции	1	0,951	0,951
	миссенс-мутации	15	0,991	0,191
	синонимичные	7	0,074	0,015
	5'UTR	1	0,994	0,994
	Общее к-во	24		
ORF10	миссенс-мутации	2	0,003	0,003
	синонимичные	1	0,022	0,022
	Общее к-во	3		
	<i>Всего мутаций:</i>	431		

Табл. 1. Количество и типы мутаций, выявленных у 324 изолятов варианта Омикрон SARS-CoV-2, секвенированных ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора.

Вариант омикрон вызвал серьезное беспокойство в первую очередь из-за большого количества мутаций в гене S (Spike). Многие из этих мутаций находятся в рецептор-связывающем домене и N-концевом домене и играют важную роль в связывании с ACE2 и распознавании вирусных частиц антителами.

У референсного варианта Омикрон (hCoV-19/SouthAfrica/NICD-N21398/2021; EPI_ISL_7456440) по сравнению с изначальным референсным штаммом Wuhan-Hu-1 (NC_045512.2) было выявлено 58 мутаций, 47 из которых приводили к аминокислотным заменам в вирусных белках, 31 из них локализована в белке S.

Всего среди 324 изолятов варианта Омикрон, секвенированных ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора, было выявлено 57 мутаций, приводящих к изменению аминокислотной последовательности вирусных белков, с частотой встречаемости не менее 4%. Из них – 48 мутаций, характерных для варианта Омикрон (таблица 2). В белке S присутствовала 31 характерная для Омикрона мутация. 15 из выявленных характерных для Омикрона мутаций и 1 дополнительная мутация (R346K) находятся в рецептор-связывающем домене (RBD) и 10 характерных для Омикрона мутаций - в рецептор-связывающем мотиве. В таблице 2 также указана локализация выявленных мутаций в функциональных районах белков SARS-CoV-2.

Семь мутаций – K417N, G446S, E484A, Q493R, G496S, Q498R и N501Y - связаны с ускользанием от взаимодействия с антителами [8]. Мутация R346K может быть

ассоциирована с изменением антигенности [28, 29], как и мутация S371L [30]. По сравнению с вариантом Альфа в варианте Омикрон присутствуют мутации N679K и P681H в сайте протеолитического расщепления, которые связаны с увеличением эффективности разрезания сайта фуриновыми протеазами, что ассоциируется с повышенной инфекционностью [14]. При этом следует отметить, что в варианте Дельта в сайте протеолитического расщепления присутствовала мутация P681R, которая усиливает эффективность расщепления фуриновой протеазой [31]. Совместное влияние двух новых мутаций в сайте протеолитического расщепления в варианте Омикрон на эффективность разрезания S белка необходимо исследовать. По предварительным данным протеолитическое расщепление S белка варианта Омикрон было менее эффективно, чем варианта Дельта [14]. Мутация H655Y, расположенная вблизи сайта расщепления фурином субъединиц S1-S2, также связана с повышенной трансмиссивностью [11, 32]

Для мутаций Δ69-70, N501Y, K417N, S477N, T478K, D614G, которые в различных комбинациях встречались и ранее, было показано влияние на усиление трансмиссивности и контагиозности вируса. D614G, которая появилась в начале 2020 года и быстро распространилась по миру, улучшает взаимодействие с ACE2, повышая контагиозность вируса [33], N501Y, характерная для вариантов Альфа, Бета и Гамма, также усиливает связывание с человеческим ACE2 [34]. Мутация Q498R в комбинации с N501Y значительно увеличивает аффинность связывания с человеческим ACE2 [35], как и замена T478K [36]. K417N, которая помимо варианта Омикрон встречается в различных линиях, в том числе у вариантов Бета и Каппа, дестабилизирует закрытую конформацию белка S и способствует образованию открытой, что увеличивает эффективность проникновения вируса в клетки [37].

Ряд потенциально важных мутаций обнаружены и в других белках. Так в составе ORF1a имеется делеция ΔL3674-G3676 (также обозначается как делеция Δ105-107 в белке NSP6), которая предположительно может способствовать уклонению от врожденного иммунитета [38]. Белок ORF9b содержит делецию 3 аминокислот: E27, N28 и A29. ORF9b участвует в подавлении врожденного иммунного ответа на вирусную инфекцию за счет взаимодействия с TOM70 и NEMO и подавления продукции интерферона [39, 40]. Экспериментально было показано, что ORF9b связывается с NEMO с помощью своей N-концевой области и что удаление первых 30 остатков ингибирует это взаимодействие [41]. Также было показано, что мутации R203K и G204R в белке N связаны с увеличением экспрессии РНК вируса [42] и увеличением вирусной нагрузки [43].

Эти и другие распространенные среди российских изолятов мутации (с частотой встречаемости не менее 4%), приводящие к изменению аминокислотных остатков в вирусных белках, приведены в табл. 2.

Позиция в геноме	ОРТ	Замена	Частота	Белок	Функциональная роль, комментарии
2832	ORF1ab	*K856R	0,90	NSP3	Ubiquitin-like 1
5730	ORF1ab	T1822I	0,04	NSP3	Папаин-подобная протеаза nsp3, Пептидаза С16, PLpro
5924	ORF1ab	V1887I	0,10	NSP3	Папаин-подобная протеаза nsp3, Пептидаза С16, PLpro
6512	ORF1ab	*S2083-L2084ΔI	0,82	NSP3	Папаин-подобная протеаза nsp3, Пептидаза С16, PLpro
8393	ORF1ab	*A2710T	0,97	NSP3	Папаин-подобная протеаза nsp3, Пептидаза С16, PLpro
10029	ORF1ab	*T3255I	1,00	NSP4	
10449	ORF1ab	*P3395H	0,79	NSP5	3С-подобная протеаза nsp5, Пептидаза С30, 3CLpro
11282	ORF1ab	*L3674_G3676Δ	0,93	NSP6	
11537	ORF1ab	*I3758V	0,97	NSP6	
13712	ORF1ab	K4483R	0,04	NSP12	РНК-зависимая РНК-полимераза
14408	ORF1ab	*P4715L	0,99	NSP12	РНК-зависимая РНК-полимераза
16744	ORF1ab	G5494S	0,04	NSP13	Геликаза
18163	ORF1ab	*I5967V	0,99	NSP14	3'-5' экзонуклеаза
21762	S	*A67V	0,99	S1	NTD, Гликозилирование-61,74
21764	S	*H69_V70del	0,98	S1	NTD, Гликозилирование-61,74
21846	S	*T95I	0,99	S1	NTD
21986	S	*G142_Y145delinsD	0,92	S1	NTD, Гликозилирование-149
22204	S	*R214_D215insEPE	0,81	S1	NTD
22578	S	*G339D	0,85	S1	RBD, Гликозилирование-331,343
22599	S	R346K	0,43	S1	RBD, Гликозилирование-343
22674	S	*S371L	0,75	S1	RBD
22679	S	*S373P	0,75	S1	RBD
22686	S	*S375F	0,75	S1	RBD
22813	S	*K417N	0,63	S1	RBD
22882	S	*N440K	0,79	S1	RBD (RBM)
22898	S	*G446S	0,78	S1	RBD (RBM)
22992	S	*S477N	0,90	S1	RBD (RBM)
22995	S	*T478K	0,90	S1	RBD (RBM)
23013	S	*E484A	0,89	S1	RBD (RBM)
23040	S	*Q493R	0,89	S1	RBD (RBM)
23048	S	*G496S	0,89	S1	RBD (RBM)
23055	S	*Q498R	0,89	S1	RBD (RBM)
23063	S	*N501Y	0,90	S1	RBD (RBM)
23075	S	*Y505H	0,90	S1	RBD (RBM)
23202	S	*T547K	0,99	S1	
23403	S	*D614G	1,00	S1	Гликозилирование-616
23525	S	*H655Y	0,99	S1	Гликозилирование-657
23599	S	*N679K	0,99	S1	Гликозилирование-676,678; вблизи полиосновного сайта
23604	S	*P681H	0,99	S1	Предполагаемый суперантигенный

					участок, может связывать ТКР-бета (TRBC1); Гликозилирование-678; протеолитическое расщепление
23664	S	A701V	0,08	S2	
23854	S	*N764K	0,99	S2	
23948	S	*D796Y	0,98	S2	
24130	S	*N856K	0,99	S2	
24424	S	*Q954H	1,00	S2	Гептадный повтор 1
24469	S	*N969K	0,99	S2	Гептадный повтор 1
24503	S	*L981F	0,99	S2	Coiled coil
25584	ORF3a	*L65I	0,98	ORF3a	Виропорин
25708	ORF3a	L106F	0,05	ORF3a	Виропорин
26270	E	*T9I	0,99	E	Поверхность вириона
26530	M	*D3G	0,71	M	Поверхность вириона, Гликозилирование-5
26577	M	*Q19E	0,96	M	Поверхность вириона
26709	M	*A63T	0,98	M	
27874	ORF7b	T40I	0,06	ORF7b	
28311	N	*P13L	0,99	N	
28361	N	*E31-S33Δ	0,95	N	
28881	N	*RG203KR	0,99	N	Область с полярными а.к.о.
29301	N	D343G	0,05	N	

Табл. 2. Частота встречаемости мутаций, приводящих к изменению аминокислотной последовательности коронавируса белков. Показаны мутации с частотой встречаемости не менее 4%. Анализ проведен с использованием полногеномных последовательностей 324 изолятов варианта Омикрон SARS-CoV-2, секвенированных ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора. Звездочкой и жирным шрифтом выделены мутации, характерные для варианта Омикрон.

При анализе изменения частоты мутаций в штаммах варианта Омикрон в России (рис. 2) среди мутаций с наибольшим изменением частоты с тенденцией увеличения распространенности с приближением к 100% были две мутации, характерные для варианта Омикрон, локализованные в RBD белка S – K417N и G446S, которые способствуют ускользанию от иммунного ответа, и мутация N440K, которая ассоциирована с усилением связывания с рецепторами ACE2 [8]. Также была отмечена тенденция увеличения частоты мутации в RBD S-белка R346K (упомянутая выше), которая не является характерной для варианта Омикрон и может влиять на антигенные свойства [29, 30]. Мутация D3G в белке M и две мутации в белке NSP3 ORF1ab:S2083-L2084ΔI и ORF1ab:K856R являются характерными для варианта Омикрон и также показали тенденцию к увеличению частоты встречаемости.

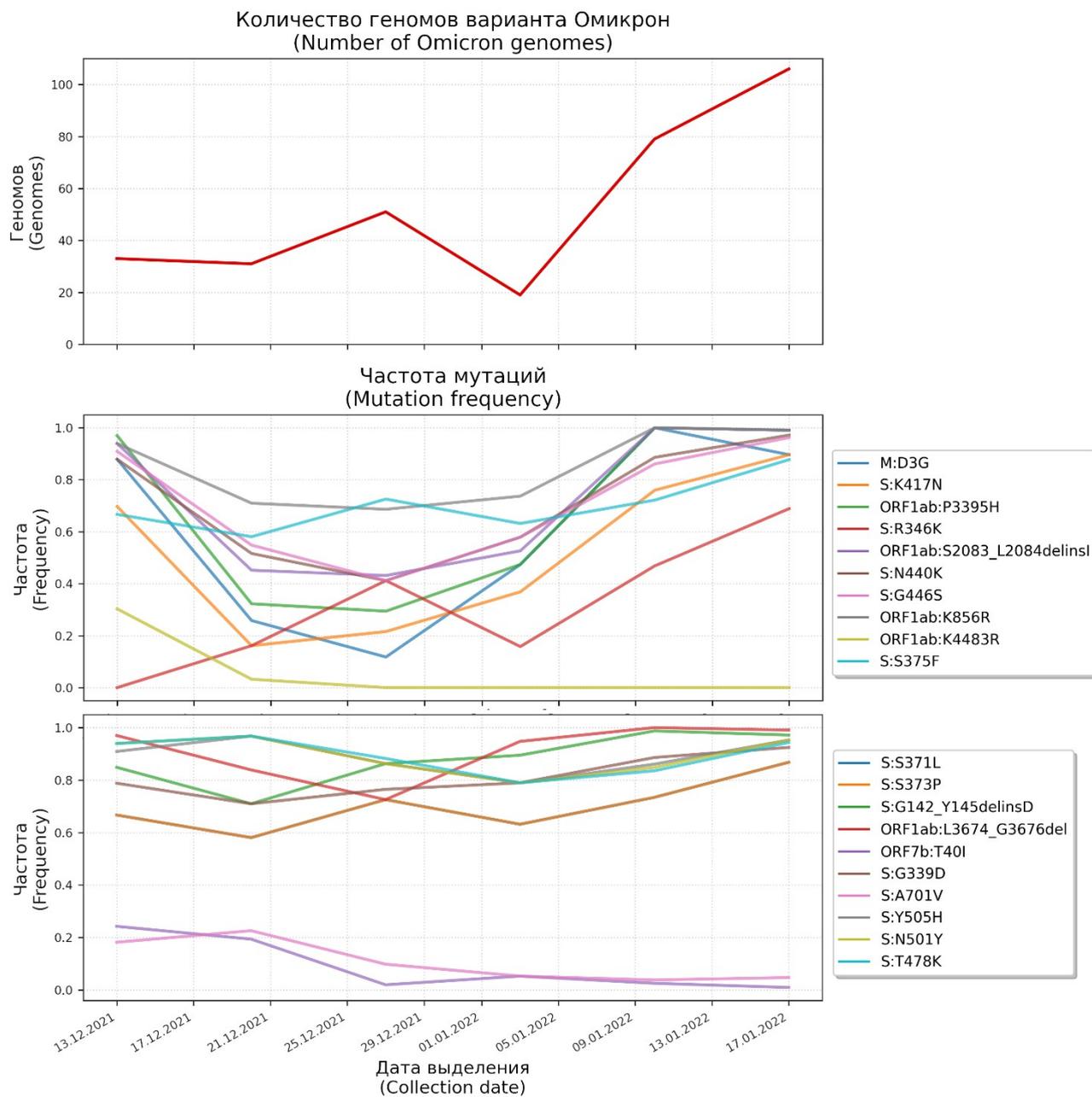


Рис. 2. Количество полногеномных последовательностей варианта Омикрон, секвенированных ГНЦ ВБ “Вектор” (вверху) еженедельно и изменение частот встречаемости значимых мутаций (Проанализировано 324 полногеномных последовательностей варианта Омикрон вируса SARS-CoV-2).

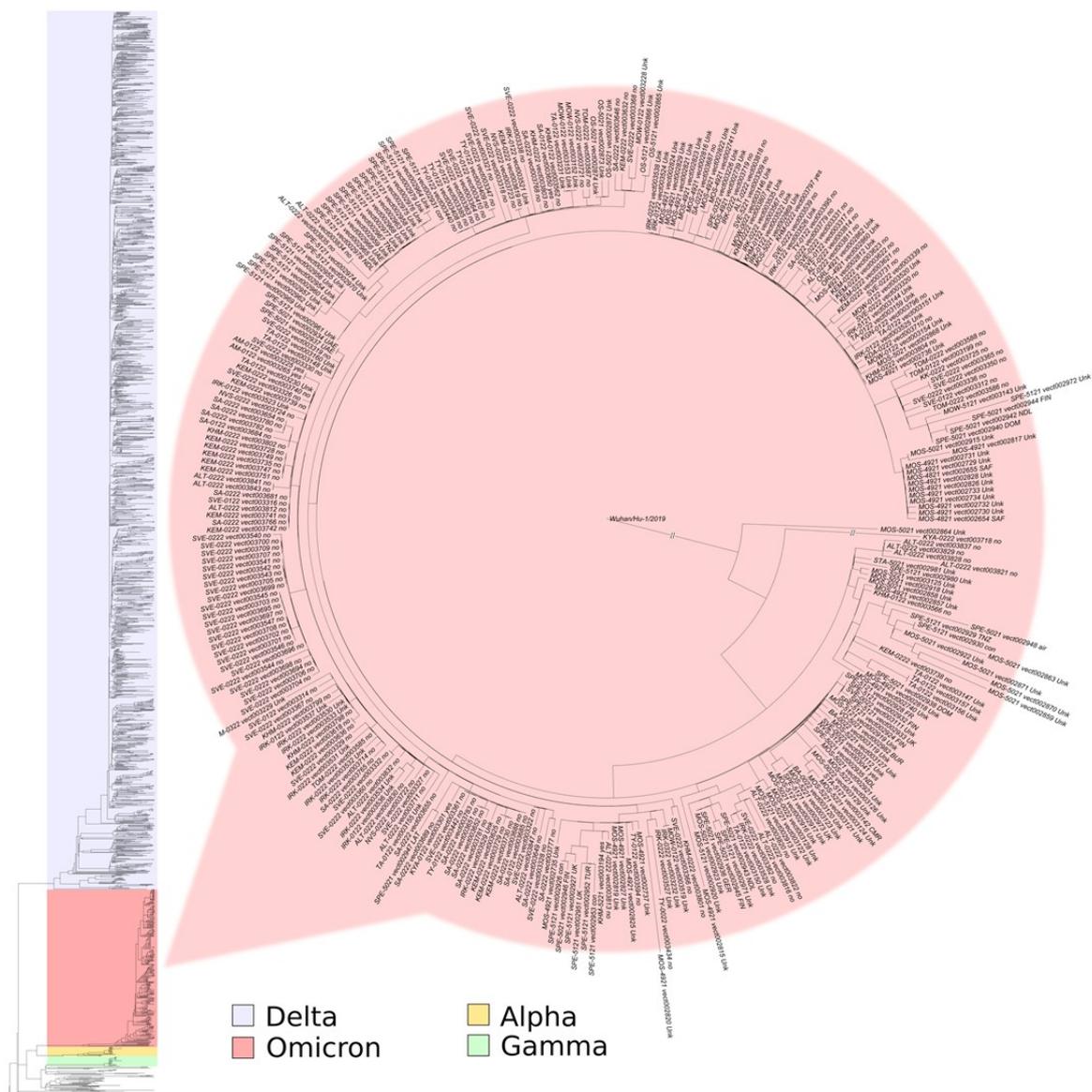


Рис. 3. Филогенетическое дерево для 2225 (из 3559) российских изолятов SARS-CoV-2, секвенированных ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора (слева) и радиальная филограмма 324 изолятов варианта Омикрон (справа). В качестве внешней группы использована референсная последовательность SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1. Филогенетические деревья построены с помощью метода максимального правдоподобия с использованием модели GTR с помощью программы IQ-TREE.

Филогенетический анализ циркулирующих штаммов варианта Омикрон на территории России с декабря 2021 года показал, что они генетически сходны с референсным вариантом Омикрон (hCoV-19/SouthAfrica/NICD-N21398/2021; EPI_ISL_7456440). На рис. 3 показано филогенетическое дерево, построенное для 2225 из 3559 изолятов SARS-CoV-2,

секвенированных ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора. Дополнительно при построении дерева были включены следующие последовательности SARS-CoV-2: Wuhan/Hu-1/2019, Wuhan/WIV04/2019, Wuhan/WH01/2019, Guangdong/20SF012/2020, Germany/BY-ChVir-929/2020, Spain/CT-ISCIII-2013597/2020, Canada/ON-PHL-8751/2020, England/MILK-9E05B3/2020 и SouthAfrica/NICD-N21398/2021. Цветом выделены клады, соответствующие основным эпидемиологически значимым вариантам. Радиальная филограмма построена для 324 изолятов, относящихся к варианту Омикрон. Терминальные узлы подписаны следующим образом: код региона, неделя года (когда был выделен образец), номер последовательности в базе VGARus, путешествовал (если известно, то указано куда) или нет. На филограмме присутствует кластеризация изолятов по регионам и дате, в некоторых случаях - вместе с завозными изолятами. В дальнейшем мы планируем провести более подробный анализ с привлечением всех данных, присутствующих в базе VGARus, и данных, депонированных в базе EpiCov VGARus.

Стоит отметить, что именно множественные мутации, характерные для варианта Омикрон, привлекли всеобщее внимание, особенно мутации, присутствующие в его S белке. Эти мутации привели к существенным изменениям вирусологических свойств, таких как повышенная трансмиссивность, уклонение от иммунного ответа и изменение тропизма [8]. Первоначальная характеристика вирусов варианта Омикрон была проведена несколькими лабораториями в мире в очень короткие сроки с момента его выявления. Вирусы варианта Омикрон имеют преимущество в заражении людей и в животных моделях на фоне иммунитета к варианту Дельта [8,14]. Также была показана сниженная эффективность широко применяемых вакцин, что приводит к быстрому распространению варианта Омикрон и в популяциях с высоким процентом вакцинированных. При этом была отмечена сниженная патогенность варианта Омикрон. Тем не менее из-за чрезвычайно высокой трансмиссивности вариант Омикрон считается опасным патогеном и необходимо применять все меры предосторожности, профилактики и лечения для защиты населения. Было показано, что дополнительная вакцинация приводила к повышенной защищенности от Омикрона и, что вакцинация эффективно предотвращает развитие тяжелых осложнений [8].

Изучение информации о генетической изменчивости вируса SARS-CoV-2, опубликованной в международной базе данных GISAID EpiCov многими коллективами, и полученной нами в ходе данного исследования, показало, что в ходе пяти пандемических волн рецепторный белок S накапливает помимо мутаций, способствующих увеличению эффективности взаимодействия с клеточными рецепторами и способствующих эффективному проникновению вируса в клетки, еще и мутации, существенно меняющие антигенный профиль этого белка, что способствует уклонению от иммунного ответа, выработанного на предыдущие варианты коронавируса, а также полученного в ходе масштабной иммунизации с использованием вакцин против исходного варианта

коронавируса. Необходимо отметить, что зачастую иммунитет после инфекции не всегда формируется на полноценном уровне, достаточном для полной элиминации вируса из организма, и что через какое-то время переболевший или вакцинированный человек снова становится мишенью для инфекции (в среднем через 6-12 месяцев), а соответственно, и благодатной почвой для возникновения новых мутантных вариантов. Кроме того, коронавирус SARS-CoV-2 может поражать и различные виды животных [44]. По-видимому, эволюция данного вируса приведет к появлению и распространению новых вариантов коронавируса, и Омикрон не является последним эпидемиологически значимым вариантом коронавируса SARS-CoV-2. Масштабная вакцинация человеческой популяции является чрезвычайно важным и эффективным средством защиты от тяжелого течения болезни и осложнений и будет способствовать снижению скорости распространения вируса. По нашему мнению, и опираясь на данные по эффективности основных вакцин против варианта Омикрон, в будущем понадобится введение процедуры контроля и обновления антигенного состава вакцин на уровне ВОЗ с определенной периодичностью, как это делается для гриппа.

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

Список литературы

1. Zhou P., Yang X.-L., Wang X.-G., Hu B., Zhang L., Zhang W., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* (2020). 579(7798):270–273.
2. Cucinotta D., Vanelli M. WHO Declares COVID-19 a Pandemic. *Acta Biomed* (2020). 91(1):157–160.
3. Coronavirus Update (Live). 352,130,563 Cases and 5,614,795 Deaths (the world); 11,108,191 Cases and 326,112 Deaths (Russia) from COVID 19 Virus Pandemic-Worldometer. <https://www.worldometers.info/coronavirus/#countries> (24/01/2022)
4. Komissarov A.B., Safina K.R., Garushyants S.K., Fadeev A.V., Sergeeva M.V., Ivanova A.A., et al. Genomic epidemiology of the early stages of the SARS-CoV-2 outbreak in Russia. *Nat Commun* (2021). 12(1):649. DOI: 10.1038/s41467-020-20880-z.
5. Harvey W.T., Carabelli A.M., Jackson B., Gupta R.K., Thomson E.C., Harrison E.M., et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat Rev Microbiol* (2021). 19(7):409–424. DOI: 10.1038/s41579-021-00573-0.
6. Tracking SARS-CoV-2 variants. <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants> (дата обращения: 26.01.22)

7. Ulrich L., Halwe N.J., Taddeo A., Ebert N., Schön J., Devisme C., et al. Enhanced fitness of SARS-CoV-2 variant of concern Alpha but not Beta. *Nature* (2021). 602(7896):307-313. DOI: 10.1038/s41586-021-04342-0.
8. Willett B.J., Grove J., MacLean O.A., Wilkie C., Logan N., De Lorenzo G., et al. The hyper-transmissible SARS-CoV-2 Omicron variant exhibits significant antigenic change, vaccine escape and a switch in cell entry mechanism. *medRxiv* (2022), DOI: 10.1101/2022.01.03.21268111.
9. <https://nextstrain.org/ncov/gisaid/global> (дата обращения 22.01.2022).
10. Wall E.C., Wu M., Harvey R., Kelly G., Warchal S., Sawyer C., et al. Neutralising antibody activity against SARS-CoV-2 VOCs B.1.617.2 and B.1.351 by BNT162b2 vaccination. *Lancet* (2021). 397(10292):2331-2333.
11. Peacock T.P., Sheppard C.M., Brown J.C., Goonawardane N., Zhou J., Whiteley M., et al. The SARS-CoV-2 variants associated with infections in India, B.1.617, show enhanced spike cleavage by furin. *bioRxiv* (2021). DOI: 10.1101/2021.05.28.446163.
12. Yuan S., Ye Z.-W., Liang R., Tang K., Zhang A.J., Lu G., et al. The SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) variant exhibits altered pathogenicity, transmissibility, and fitness in the golden Syrian hamster model. *bioRxiv* (2022). DOI: 10.1101/2022.01.12.476031.
13. Yangyang Y., Liu Y, Shi Zh., Daihai H. A Simple Model to Estimate the Transmissibility of SARS-COV-2 Beta, Delta and Omicron Variants in South Africa (December 20, 2021). SSRN (2021). DOI: 10.2139/ssrn.3989919.
14. Suzuki R., Yamasoba D., Kimura I., Wang L., Kishimoto M., Ito J., et al. Attenuated fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Omicron variant. *Nature* (2022). DOI: 10.1038/s41586-022-04462-1.
15. Lippi G., Mattiuzzi C., Henry B.M. Neutralizing potency of COVID-19 vaccines against the SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) variant. *J Med Virol.* (2022), DOI: 10.1002/jmv.27575.
16. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* (2011). 17:200. DOI: 10.14806/ej.17.1.200.
17. Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *arXiv* (2013):1303.3997v2
18. Danecek P., Bonfield J.K., Liddle J., Marshall J., Ohan V., Pollard M.O. et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience* (2021). 10(2):giab008.
19. Grubaugh N.D., Gangavarapu K., Quick J., Matteson N.L., De Jesus J.G., Main B.J. et al. An amplicon-based sequencing framework for accurately measuring intrahost virus diversity using PrimalSeq and iVar. *Genome Biol.* (2019). 20(1):8. DOI: 10.1186/s13059-018-1618-7.
20. Katoh K., Misawa K., Kuma K., Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* (2002). 30(14):3059-3066. DOI: 10.1093/nar/gkf436.

21. Nguyen L.-T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* (2015) 32:268-274. DOI: 10.1093/molbev/msu300.
22. O'Toole A., Scher E., Underwood A., Jackson B., Hill V., McCrone J.T. et al. Assignment of epidemiological lineages in an emerging pandemic using the pangolin tool. *Virus Evol.* (2021). 7(2):veab064. DOI: 10.1093/ve/veab064.
23. Li H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics* (2018). 34(18): 3094–3100. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty191.
24. Garrison E., Marth G., Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. *arXiv* (2012): 1207.3907.
25. Cingolani P., Platts A., Wang le L., Coon M., Nguyen T., Wang L. et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly* (2012). 6(2):80-92. DOI: 10.4161/fly.19695.
26. Paradis E., Schliep K. ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics* (2019). 35:526-528.
27. Miles A., pyup.io bot, Murillo R., Ralph P., Harding N., Pisupati R., Rae S., Millar T. scikit-allel: A Python package for exploring and analysing genetic variation data. 2021. DOI: 10.5281/zenodo.4759368.
28. Lu L., Mok B.W., Chen L.L., Chan J.M., Tsang O.T., Lam B.H. et al. Neutralization of SARS-CoV-2 Omicron variant by sera from BNT162b2 or Coronavac vaccine recipients. *Clin Infect Dis.* (2021). ciab1041, DOI: 10.1093/cid/ciab1041.
29. Weisblum Y., Schmidt F., Zhang F., DaSilva J., Poston D., Lorenzi J.C., et al. Escape from neutralizing antibodies by SARS-CoV-2 spike protein variants. *Elife* (2020). 9:e61312. DOI: 10.7554/eLife.61312.
30. D'Agnillo F., Walters K.-A., Xiao Y., Sheng Z.-M., Scherler K., Park J., et al. Lung epithelial and endothelial damage, loss of tissue repair, inhibition of fibrinolysis, and cellular senescence in fatal COVID-19. *Sci Transl Med.* (2021). 13(620):eabj7790.
31. Saito A., Irie T., Suzuki R., Maemura T., Nasser H., Uriu K., et al. Enhanced fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Delta P681R mutation. *Nature* (2022). 602(7896):300-306. DOI: 10.1038/s41586-021-04266-9.
32. Gong S.Y., Chatterjee D., Richard J., Prevost J., Tauzin A., Gasser R., et al. Contribution of single mutations to selected SARS-CoV-2 emerging variants Spike antigenicity. *Virology* (2021). 563:134-145. DOI: 10.1016/j.virol.2021.09.001.
33. Plante J.A., Liu Y., Liu J., Xia H., Johnson B.A., Lokugamage K.G., et al. Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness. *Nature* (2021). 592(7852):116-121. DOI: 10.1038/s41586-020-2895-3.

34. Zhao S., Lou J., Cao L., Zheng H., Chong M.K.C., Chen Z., et al. Quantifying the transmission advantage associated with N501Y substitution of SARS-CoV-2 in the UK: an early data-driven analysis. *J Travel Med* (2021). 28(2):taab011. DOI: 10.1093/jtm/taab011.
35. Zahradník J., Marciano S., Shemesh M., Zoler E., Harari D., Chiaravalli J., et al. SARS-CoV-2 variant prediction and antiviral drug design are enabled by RBD in vitro evolution. *Nat Microbiol* (2021) 6(9):1188–1198. DOI: 10.1038/s41564-021-00954-4.
36. Di Giacomo S., Mercatelli D., Rakhimov A., Giorgi F.M. Preliminary report on severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Spike mutation T478K. *J Med Virol* (2021). 93(9):5638–5643. DOI: 10.1002/jmv.27062.
37. Winger A, Caspari T. The Spike of Concern – The Novel Variants of SARS-CoV-2. *Viruses* (2021). 13(6):1002. DOI: 10.3390/v13061002.
38. Benvenuto D., Angeletti S., Giovanetti M., Bianchi M., Pascarella S., Cauda R., et al. Evolutionary analysis of SARS-CoV-2: how mutation of Non-Structural Protein 6 (NSP6) could affect viral autophagy. *J Infect* (2020). 81(1):e24–27.
39. Beyer D.K., Forero A. Mechanisms of Antiviral Immune Evasion of SARS-CoV-2. *J Mol Biol.* (2021) 167265. DOI: 10.1016/j.jmb.2021.167265.
40. Thorne L.G., Bouhaddou M., Reuschl A.-K., Zuliani-Alvarez L., Polacco B., Pelin A., et al. Evolution of enhanced innate immune evasion by the SARS-CoV-2 B.1.1.7 UK variant. *bioRxiv* (2021). DOI: 10.1101/2021.06.06.446826.
41. Wu J., Shi Y., Pan X., Wu S., Hou R., Zhang Y., et al. SARS-CoV-2 ORF9b inhibits RIG-I-MAVS antiviral signaling by interrupting K63-linked ubiquitination of NEMO. *Cell Rep* (2021). 34(7):108761.
42. Leary S., Gaudieri S., Parker M.D., Chopra A., James I., Pakala S., et al. Generation of a novel SARS-CoV-2 sub-genomic RNA due to the R203K/G204R variant in nucleocapsid: homologous recombination has potential to change SARS-CoV-2 at both protein and RNA level. *Pathog Immun.* (2021). 6(2):27-49. DOI: 10.20411/pai.v6i2.460.
43. Mourier T., Shuaib M., Hala S., Mfarrej S., Alofi F., Naeem R., et al. SARS-CoV-2 genomes from Saudi Arabia implicate nucleocapsid mutations in host response and increased viral load. *Nat Commun.* (2022). 13(1):601. DOI: 10.1038/s41467-022-28287-8.
44. Abdel-Moneim A.S., Abdelwhab E.M. Evidence for SARS-CoV-2 Infection of Animal Hosts. *Pathogens* (2020). 9(7):529. DOI: 10.3390/pathogens9070529.