

Сравнительный анализ разнообразия линий SARS-CoV-2, циркулирующих в Омской области в 2020–2022 годах

Е. А. Градобоева^{*1}, Ж. С. Тюлько^{1,2}, А. В. Фадеев³, А. Г. Василенко¹, В. В. Якименко¹

¹ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, г. Омск, Россия

²ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Омск, Россия

³ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме

Актуальность. До настоящего времени не проводилось детального анализа циркулирующих в разное время вариантов возбудителя на территории Омской области. **Цель.** Провести сравнительный анализ разнообразия циркулирующих генетических вариантов вируса SARS-CoV-2 на основе молекулярно-генетических данных, определить генетические линии вируса и время их появления, сравнить полученные данные с данными базы GISAID. **Материалы и методы.** Проведено полногеномное секвенирование 222 первичных и 5 культуральных (пассажи на культурах клеток Vero E6 и СПЭВ) образцов вируса SARS-CoV-2, собранных в Омской области с апреля 2020 г. по февраль 2022 г., на платформах Oxford Nanopore Technologies и Illumina. Генетические линии определяли в Pangolin. Анализ проводили в MEGA7 и BioEdit. **Результаты.** Получено 227 полногеномных последовательностей вируса SARS-CoV-2. В базу данных GISAID загружено 222 генома. Определены линии, к которым относятся образцы, построены филогенетические деревья по различным областям генома вируса SARS-CoV-2, проведены оценка уровня гомологии геновариантов вируса и анализ мутаций в области S-белка. **Выводы.** По полученным данным можно ориентировочно судить о времени появления того или иного варианта вируса SARS-CoV-2, его закреплении и распространении в популяции, наблюдать редкие мутации и циркуляцию некоторых редких генетических линий вируса. Для оценки возможности значимых географически привязанных изменений генома вируса SARS-CoV-2 в Омской области полученных данных недостаточно. Варианты вируса, циркулирующие в области, группируются в один кластер с идентичными вариантами из других областей или стран. Более выраженную внутрикластерную дифференцировку линий можно наблюдать при анализе области RBD. Ситуация по COVID-19 в Омской области в целом совпадает с таковой во всей стране и мире. Однако это не исключает параллельного возникновения определённых мутаций на отдалённых друг от друга территориях.

Ключевые слова: COVID-19, Омская область, мониторинг, секвенирование SARS-CoV-2, геноварианты, линии SARS-CoV-2
Конфликт интересов не заявлен.

Для цитирования: Градобоева Е. А., Тюлько Ж. С., Фадеев А. В. и др. Сравнительный анализ разнообразия линий SARS-CoV-2, циркулирующих в Омской области в 2020–2022 гг. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2022;21(6): 24–33. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-6-24-33>

Comparative Analysis of the Diversity of SARS-CoV-2 Lines Circulating in Omsk Region in 2020–2022

EA Gradoboeva^{**1}, ZhS Tyulko^{1,2}, AV Fadeev³, AG Vasilenko¹, VV Yakimenko¹

¹Federal Budgetary Institution of Science «Omsk Research Institute of Natural Focal Infections», Rospotrebnadzor, Omsk, Russia

²Federal State Budgetary Educational Institution «Omsk State Medical University» of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Omsk, Russia

³Federal State Budgetary Institution «Smorodintsev Research Influenza Institute» of Ministry of Health of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia

Abstract

Relevance. To date, no detailed analysis of the variants of the pathogen circulating at different times on the territory of the Omsk region has been carried out. **Aim.** Comparative analysis of the diversity of circulating variants of SARS-CoV-2 based on molecular genetic data, determine the lines and time of their appearance, compare the data obtained with data from the GISAID database.

^{*} Для переписки: Градобоева Екатерина Алексеевна, младший научный сотрудник ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, 644080, г. Омск, пр. Мира, 7. +7 (908) 805-45-08, gradoboeva_ea@oniipi.org.
©Градобоева Е. А. и др.

^{**} For correspondence: Gradoboeva Ekaterina A., junior researcher Omsk Research Institute of Natural Focal Infections Rospotrebnadzor, 7, pr. Mira, Omsk, 644080, Russia. +7 (908) 805-45-08, gradoboeva_ea@oniipi.org. ©Gradoboeva, et al.

Materials and methods. Genome-wide sequencing of 222 primary and 5 culture (passages on Vero E6 and SPEV cell cultures) samples of SARS-CoV-2 from the Omsk region, collected from April 2020 to February 2022, on Oxford Nanopore Technologies and Illumina platforms, was carried out. Genetic lines were determined in Pangolin. The analysis was performed in MEGA7 and BioEdit.

Results. 227 genome-wide SARS-CoV-2 sequences were obtained. 222 genomes have been uploaded to the GISAID database. The lines to which the samples belong were determined, phylogenetic trees were constructed for various regions of the SARS-CoV-2 genome, the levels of virus homology were assessed and mutations in the S-protein region were analyzed. **Conclusions.** According to the data obtained, it is possible to roughly judge the time of the appearance of a particular variant, its consolidation and distribution in the population, and observe the rare mutations and the circulation of some rare lines. To assess the possibility of significant geographically linked changes in the SARS-CoV-2 genome in the Omsk region, the data obtained are insufficient. Virus variants circulating in the region are grouped into one cluster with identical variants from other regions or countries. A more pronounced intracluster differentiation of the lines can be observed when analyzing the RBD region. The situation with COVID-19 in the Omsk region generally coincides with that in the whole country and the world. However, this does not exclude the parallel occurrence of certain mutations in remote territories from each other.

Keywords: COVID-19, Omsk region, monitoring, sequencing of SARS-CoV-2, genovariants, SARS-CoV-2 lineages

No conflict of interest to declare.

For citation: Gradoboeva EA, Tyulko ZhS, Fadeev AV et al. Comparative Analysis of the Diversity of SARS-CoV-2 Lines Circulating in Omsk Region in 2020-2022. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2022;21(6): 24–33 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-6-24-33>

Введение

Коронавирус SARS-CoV-2 является причиной такого заболевания, как новая коронавирусная инфекция, именуемая 2019-nCoV или, позднее, COVID-19, которая впервые вспыхнула в декабре 2019 г. в Китае в г. Ухань [1]. Болезнь быстро распространилась на другие страны и континенты, и 31 января 2020 г. – через месяц после первого случая в Ухане – количество подтверждённых случаев новой коронавирусной инфекции в мире составило 9826 [2]. Уже в начале марта 2020 г. ВОЗ объявила о пандемии SARS-CoV-2 ввиду скорости и масштабов распространения инфекции [3]. В семейство *Coronaviridae*, к которому относится SARS-CoV-2, входят и другие эпидемически значимые вирусы – SARS-CoV и MERS-CoV, характеризующиеся частыми возникновениями геномных изменений, таких как мутации, делеции и рекомбинации [4,5]. Также и SARS-CoV-2 претерпел тысячи одиночных мутаций [6] с момента сборки первого генома в январе 2020 г. [1]. Однако большинство мутаций не влияют на вирулентность и распространение вируса. Наиболее значимые мутации возникают в S-белке, а именно в рецептор-связывающем домене (Receptor-Binding Domain, RBD). Эти мутации ведут к изменению связывания RBD с рецептором клеток – ангиотензинпревращающего фермента 2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2, ACE2), что часто усиливает инфекционность вируса и определяет появление новых генетических вариантов SARS-CoV-2 [7]. Массовое секвенирование генома SARS-CoV-2 даёт возможность быстро выявлять и изучать изменение структуры генома вируса, его эволюцию, а также осуществлять вероятностное прогнозирование появления новых субтипов вируса [7,8]. С начала пандемии в международной базе данных GISAID [9] депонировано 11 585 177 геномов

SARS-CoV-2 (по данным на 27.06.2022). По данным Роспотребнадзора, на 27.06.2022 в Российской Федерации зарегистрировано 18 421 564 случаев COVID-19, в Омской области – 208 649 (<https://стопкоронавирус.рф>). Актуальность исследования заключается в том, что, несмотря на продолжающуюся регистрацию новых случаев COVID-19, до настоящего времени не проводилось детального изучения циркулирующих в разное время вариантов возбудителя на территории Омской области.

Цель – провести сравнительный анализ разнообразия циркулирующих генетических вариантов SARS-CoV-2 на основе молекулярно-генетических данных, определить генетические линии, выявленные на территории области, и время их появления, а также сравнить полученные нуклеотидные последовательности с некоторыми последовательностями из базы GISAID, представляющими отдельные варианты SARS-CoV-2.

Материалы и методы

Образцы смывов из рото- и носоглотки в транспортной или вирусологической среде были доставлены из медицинских учреждений г. Омска для диагностики COVID-19 и проведения фрагментного секвенирования вируса SARS-CoV-2 во ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора. Руководящими документами были: «Временные рекомендации по лабораторной диагностике новой коронавирусной инфекции, вызванной 2019-nCoV» [10] и приказ Роспотребнадзора от 19.02.2021 №56 «О совершенствовании молекулярно-генетического мониторинга штаммов возбудителя новой коронавирусной инфекции». Было проведено полногеномное секвенирование 222 первичных и 5 культуральных (пассажи на культурах клеток Vero E6 и СПЭВ) образцов

Original Articles

SARS-CoV-2, собранных в Омской области с апреля 2020 г. по февраль 2022 г., на платформах Oxford Nanopore Technologies и Illumina.

Отбор образцов

Образцы предварительно диагностировали в ПЦР Real time с помощью различных зарегистрированных отечественных тест-систем: «Вектор-ПЦР-2019-nCoV-RG» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирск), «SARS-CoV-2/SARS-CoV» (ДНК-Технология, Москва), «АмплиСенс® Cov-Bat-FL» (АмплиСенс, Москва), «ОТ-ПЦР-PB-SARS-CoV-2» (Синтол, Москва), «АмплиПрайм® SARS-CoV-2 DUO» (НекстБио, Москва), «РеалБест РНК SARS-CoV-2» (Вектор-Бест, Новосибирск), «COVID-2019 Amp», (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург). Для полногеномной амплификации отбирали образцы с пороговым циклом (Ct) не более 23.

Выделение нуклеиновых кислот

Процедуру проводили на автоматических станциях KingFisherFlex 96 (Thermo Fisher, США) и AutoPure96 (Allsheng, Китай) наборами для выделения на магнитных частицах (Биолабмикс, Новосибирск; Вектор-Бест, Новосибирск) или ручным методом с использованием набора «РИБО-преп» (АмплиСенс, Москва) или набора для выделения на колонках (Биолабмикс, Новосибирск).

Амплификация и секвенирование фрагментов

Использовали набор «БиоМастер ОТ-ПЦР–Color (2x)» (Биолабмикс, Новосибирск) и праймеры F44, R44, F47, R47 из описанного ранее протокола [11] для получения двух фрагментов гена S-белка вируса, результат амплификации оценивали по разделению продуктов реакции методом электрофореза в 1,7% агарозном геле. Секвенирование фрагментов проводили по методу Сенгера на капиллярных секвенаторах ABI 3500XI и SeqStudio Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием набора BigDye Terminator v1.1 (Applied Biosystems, США).

Полногеномная амплификация

Осуществляли по протоколам ARTIC V3 и ARTIC V4 (https://github.com/joshquick/artic-ncov2019/tree/master/primer_schemes/nCoV-2019) с использованием наборов «БиоМастер ОТ-ПЦР–Премиум (2x)» (Биолабмикс, Новосибирск) или NEBNext® ARTIC SARS-CoV-2 Companion Kit (New England Biolabs, США). Результаты оценивали в 1,7% агарозном геле или по кривой плавления с SYBR Green.

Подготовка библиотек и секвенирование

При подготовке библиотек Oxford Nanopore следовали инструкциям производителя и использовали набор «Ligation Sequencing kit 1D», «Набор для PCR-free мультиплексирования Native

Barcoding Expansion 1-96», «Набор для мультиплексирования PCR Barcoding Kit 96» (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Подготовку библиотек Illumina проводили с набором «Illumina DNA Prep» и «IDT for Illumina DNA UD Indexes» (Illumina, США) по инструкции. Секвенировали на приборах MinION с проточной ячейкой r9.4.1. и Illumina MiSeq с MiSeq Reagent Kits v3 600-cycle.

Сборка генома и анализ данных

Сборку геномов проводили с использованием программ minimap2 [12], SAMtools [13], iVar [14], Medaka (<https://github.com/nanoporetech/medaka>), BWA-MEM [15] и LoFreq [16] путём выравнивания на референсную последовательность Wuhan-Hu-1 (NCBI Reference Sequence: NC_045512.2). Множественное выравнивание выполняли в Unipro UGENE [17]. Филогенетическое дерево строили в MEGA7 [18] методом Neighbor-joining, уровень bootstrap-поддержки оценивали в 500 повторях. Количество мутаций рассчитывали в MEGA7. Уровни гомологии рассчитаны в BioEdit [19]. Генетические линии определяли в Pangolin (<https://pangolin.cog-uk.io>). Сборку и анализ данных фрагментного секвенирования осуществляли в Unipro UGENE.

Результаты и обсуждение

Получено 227 полногеномных последовательностей SARS-CoV-2, из них 222 последовательности первичных образцов и 5 – штаммов, изолированных на культурах клеток СПЭВ и Vero E6. В базу данных GISAID загружено 222 генома. Распределение генетических линий во времени исходя из полученных результатов представлено в таблице 1.

По полученным данным видно, что наибольшее число из анализируемых нами вирусов SARS-CoV-2, выявленных в Омской области с апреля 2020 г. по июнь 2021 г., относятся к B.1.1 (50,2%). Достаточно часто встречались также линии B.1.1.163 (12,4%), B.1.1.506 (7,4%) и B.1.1.294 (5,1%). Исходя из данных таблицы 1, можно предположить, что вариант Delta начал циркулировать в Омской области уже в мае 2021 г. (первый геном от 15.05.2021). Видно, что с мая–июня этого года он начал вытеснять другие линии SARS-CoV-2 вплоть до января 2022 г., когда был обнаружен новый вариант вируса. Вариант Omicron появился в области вероятно в начале января 2022 г. (первый геном от 05.01.2022) и начал замещать преобладающий ранее вариант Delta.

При построении филогенетического дерева были вырезаны непокрытые консервативные участки генома. Последовательности, имеющие протяженные несеквенированные участки или непокрытую вариативную часть генома, были удалены из анализа. Ввиду массивности полученного дерева, последовательности, имевшие низкие уровни bootstrap-поддержки в отдельных кластерах, были сгруппированы по временному

Таблица 1. Представленность циркулирующих генетических линий в Омской области и время их выявления (серым отмечены линии, относящиеся к VOC (Variants of Concern) Delta (B. 1.617.2+AY. *) и Omicron (B. 1.1.529+BA. *))

Table 1. The representation of circulating genetic lines in the Omsk region and the time of their detection (lines related to VOC (Variants of Concern) Delta (B. 1.617.2+AY. *) and Omicron (B. 1.1.529+BA. *) are marked in gray)

Линия Rango Pango lineage v.4.1.1	Количество сиквенсов абс. Number of sequences abs.	Количество сиквенсов отн. % Number of sequences rel. %	Когда встречались When were they detected		
			2020	2021	2022
AT.1	2	0,9%		мар. Mar.	
AY.122 (Delta)	14	6,5%		май, июн., сен., окт., ноя., дек. May, Jun., Sep., Oct., Nov., Dec.	янв. Jan.
B.1	1	0,5%	апр. Apr.	мар. Mar.	
B.1.1	109	50,2%	апр., май, июн., июл., авг., сен., ноя., дек. Apr., May, Jun., Jul., Aug., Sep., Nov., Dec.	янв., мар., апр., май Jan., Mar., Apr., May	
B.1.1.121	1	0,5%		фев. Feb.	
B.1.1.141	4	1,8%	ноя. Nov.	мар. Mar.	
B.1.1.161	2	0,5%		фев., мар. Feb., Mar.	
B.1.1.163	27	12,4%	июн., июл. Jun., Jul.		
B.1.1.172	1	0,5%		фев. Feb.	
B.1.1.184	7	3,2%	май, июл. May, Jul.		
B.1.1.294	11	5,1%	май, июн., июл. May, Jun., Jul.	мар. Mar.	
B.1.1.31	1	0,5%	июн. Jun.		
B.1.1.317	1	0,5%		май May	
B.1.1.37	1	0,5%	апр. Apr.		
B.1.1.370	1	0,5%		мар. Mar.	
B.1.1.396	1	0,5%	июл. Jul.		
B.1.1.398	1	0,5%		мар. Mar.	
B.1.1.409	1	0,5%	июн. Jun.		
B.1.1.506	16	7,4%	май, июл. May, Jul.		
B.1.617.2 (Delta)	3	1,4%		авг., сен. Aug., Sep.	янв. Jan.
BA.1 (Omicron)	2	0,9%			фев. Feb.
BA.1.1 (Omicron)	6	2,8%			янв., фев. Jan., Feb.

Таблица 1. Продолжение
Table 1. Continuation

Линия Pango Pango lineage v.4.1.1	Количество сиквенсов абс. Number of sequences abs.	Количество сиквенсов отн. % Number of sequences rel. %	Когда встречались When were they detected		
			2020	2021	2022
BA.1.15 (Omicron)	1	0,5%			фев. Feb.
BA.2 (Omicron)	1	0,5%			фев. Feb.
Unassigned	3	1,4%			
Итого Total	217	100%			

признаку (месяц отбора образца) для наглядности (итоговое число анализируемых геномов $n = 47$). Были построены деревья по полному геному и, с этой же выборкой, по вырезкам генов поверхностного гликопротеина S (в том числе отдельно по области, включающей RBD), нуклеокапсида N и оболочечного и мембранного белков E и M соответственно (вместе).

Наибольший интерес представляют результаты, полученные на основании полного генома и области RBD (рис. 1 и рис. 2 соответственно). Деревья, построенные по другим областям генома SARS-CoV-2, не показали существенных отличий вирусов между собой, вследствие чего рисунки не приводятся.

На рисунке 1 представлено филогенетическое дерево, построенное по полному геному. Заметно, что последовательности группируются по геновариантам. В некоторых случаях последовательности, классифицированные Pangolin идентично, различаются в зависимости от страны выявления.

При рассмотрении филогенетического дерева, полученного из вырезанного фрагмента генома, включающего RBD (см. рис. 2), видно, что последовательности так же кластеризуются по вариантам.

В этой части генома в пределах вариантов Omicron внутри кластера наблюдается более чёткое распределение по сублиниям. Так, например, заметно отделение линий варианта Omicron BA.1 от BA.1.1* и BA.2*. Среди вариантов Alpha и Beta последовательности из РФ группируются отдельно от последовательностей из Англии и Африки соответственно, несмотря на то, что отнесены Pangolin к одной и той же линии. В случае с вариантом Beta такое же отделение наблюдается и при использовании для построения дендрограммы полного генома (см. рис. 1). Что касается варианта Gamma, то чёткого разделения между линиями P.1 и P.1.16 не отмечается, однако в области RBD линия P.1 из Бразилии (где этот вариант был впервые обнаружен) лежит отдельно от линий P.1 и P.1.16 из Европы (Франция и Россия). По варианту Delta внутрикластерное расхождение линий представлено более чётко при анализе полного генома, чем по области RBD.

Таким образом, последовательности вариантов Delta и Omicron из Омской области также укладываются в соответствующий кластер (см. рис. 1 и 2). Однако в случае варианта Delta, в области RBD они не имеют выраженных отличий от других геномов в группе, тогда как при анализе полного генома внутрикластерные отличия более выражены, а в случае варианта Omicron – наоборот: больший интерес представляет распределение геномов по области RBD.

Проведён подсчёт количества мутаций в 188 нуклеотидных последовательностях, кодирующих S-белок вируса (число анализируемых кодонов $n = 1157$). Количество несинонимичных замен составило 50, синонимичных – 15. При этом почти 40% несинонимичных замен и лишь 27% синонимичных приходится на область S-белка, кодирующую RBD. Соотношение транзиций к трансверсиям равно 1,396. В таблице 2 приводится список аминокислотных замен в области RBD (а.о. 319-541), а также проявление этих мутаций в линиях Pango.

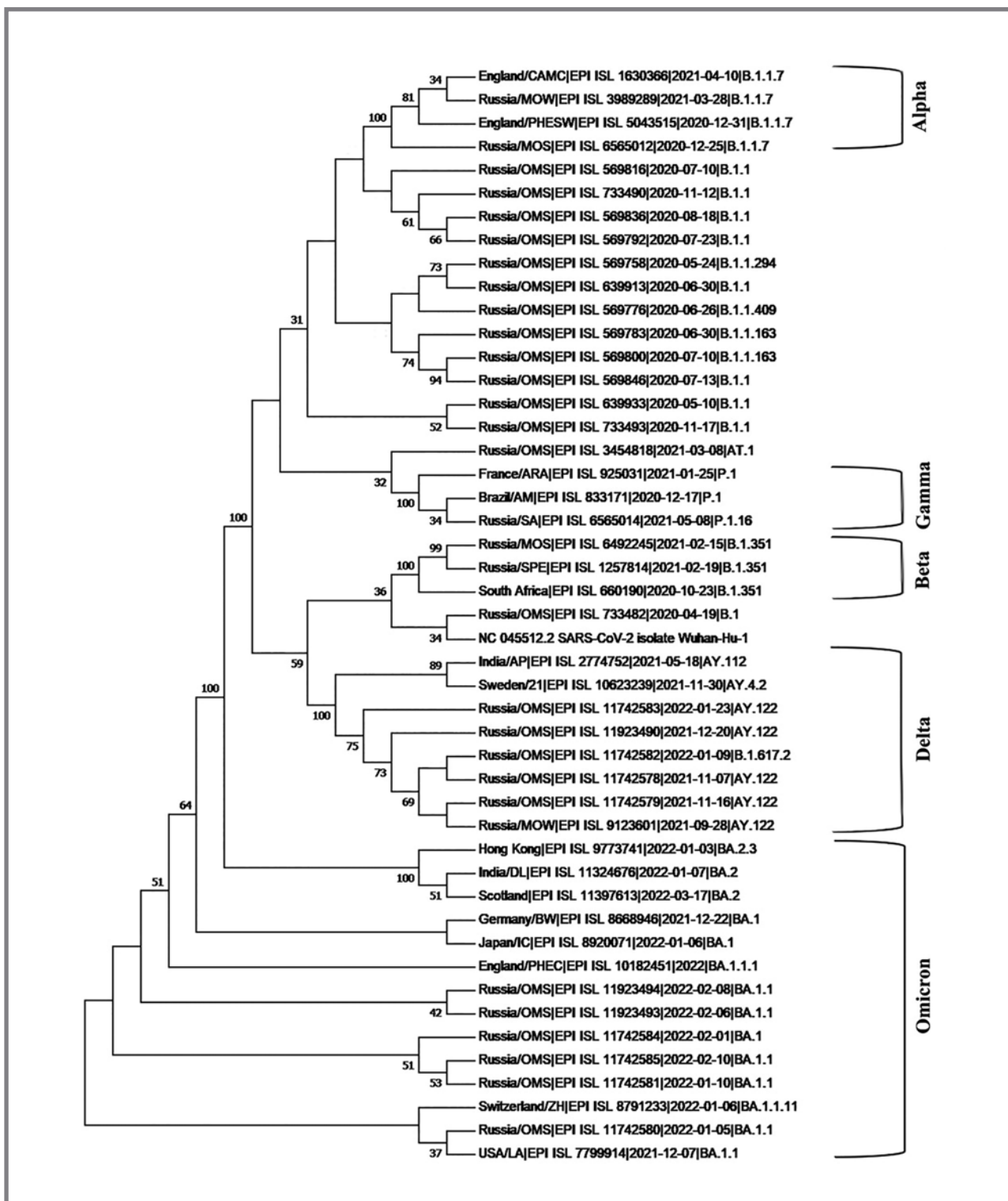
Из таблицы 2 видно, что большая часть мутаций в этой области являются типичными для линий вариантов Delta и Omicron, причём большая часть из них встречается в варианте Omicron. Однако среди наиболее распространённых мутаций (таких, например, как T478K или L452R) в геномах из Омской области встречаются также довольно редкие замены. Например, замена V367I, которая встречалась лишь в 39 геномах в России, в том числе в одном из г. Омска. Или L368I, встречаемость которой еще меньше – 21 российский геном, один из которых – омский.

При оценке уровней гомологии, для чего использовали данные полных геномов, наблюдаемые различия не превышали 0,8% (ввиду массивности таблица не приводится).

Преобладание в течение длительного времени линии B.1.1 объясняется, по-видимому, первоначальным распространением нового вируса среди неиммунного населения и, как следствие, высокой чувствительности человека к нему. Вероятно, с появлением иммунной прослойки, а также при инфицировании лиц с нарушениями в иммунной системе, вирус SARS-CoV-2 начал стремительно

Рисунок 1. Филогенетическое дерево, построенное по полным геномам SARS-CoV-2 методом Neighbor-joining с bootstrap-поддержкой равной 500. Скобками обозначены наиболее значимые геноварианты (Alpha, Beta, Gamma, Delta, Omicron)

Figure 1. Phylogenetic tree constructed from complete SARS-CoV-2 genomes by Neighbor-joining with bootstrap support equal to 500. Brackets indicate the most significant gene variants (Alpha, Beta, Gamma, Delta, Omicron)



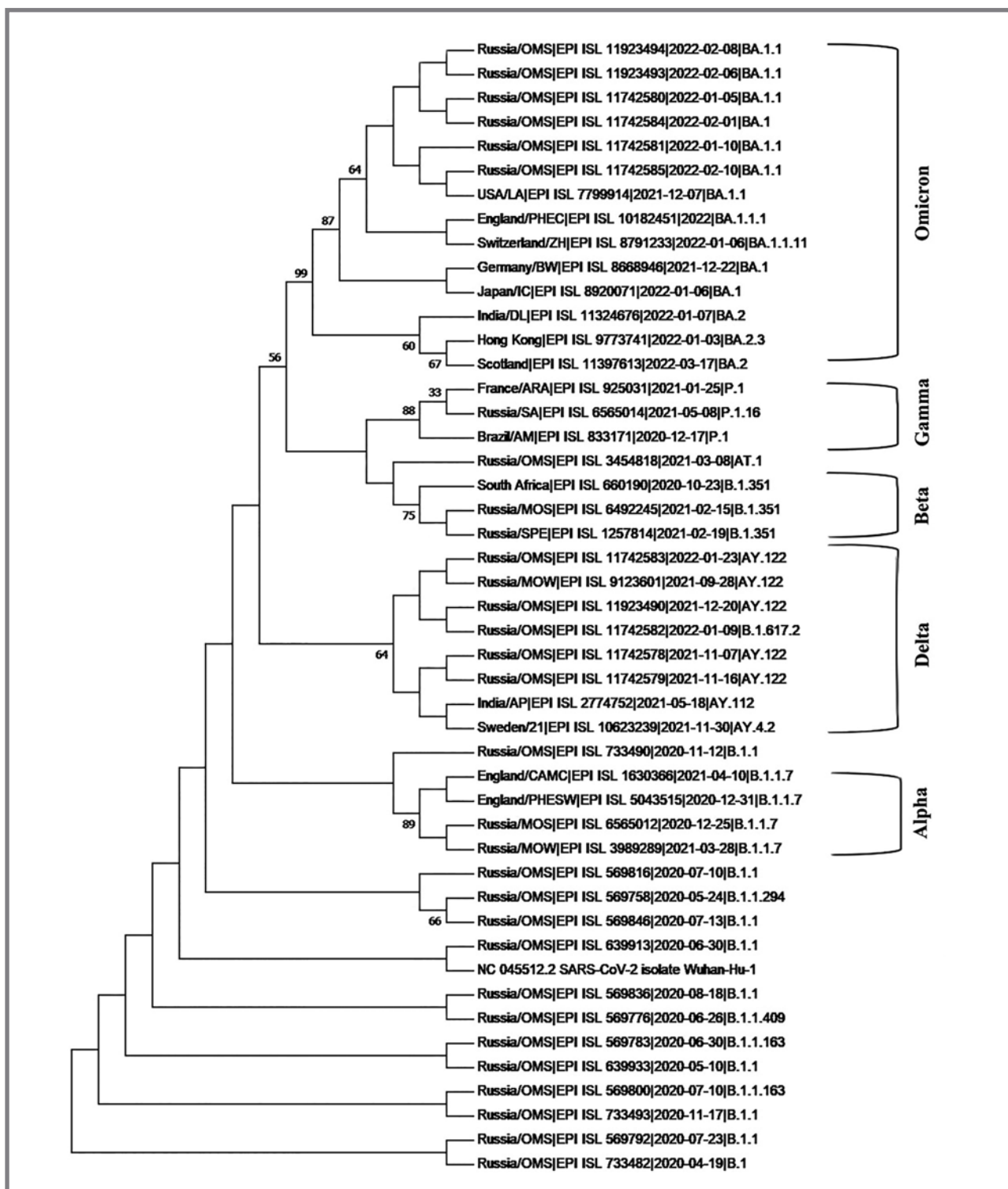
меняться, приобретая высокую инфекционность и уклоняясь от иммунного ответа, в результате чего новые линии замещают распространяемые ранее, как, например, в случае с возникновением вариантов Delta и Omicron [20,21]. Появление вариантов Delta и Omicron в Омской области примерно

совпадает по срокам с обнаружением этих вариантов в Москве и Санкт-Петербурге (апрель 2021 г. и декабрь 2021 г. соответственно), хотя основная волна происходила с небольшой задержкой, что связано с распространением патогена по логистическим цепочкам внутри страны.

Original Articles

Рисунок 2. Филогенетическое дерево, построенное по области генома SARS-CoV-2, включающей RBD (1156 н.о.), методом Neighbor-joining с bootstrap-поддержкой равной 500. Скобками обозначены наиболее значимые геноварианты (Alpha, Beta, Gamma, Delta, Omicron)

Figure 2. Phylogenetic tree constructed from the SARS-CoV-2 genome region, including RBD (1156 n.o.), by Neighbor-joining method with bootstrap support equal to 500. Brackets indicate the most significant gene variants (Alpha, Beta, Gamma, Delta, Omicron)



Любопытно, что среди случайно выбранных для полногеномного секвенирования образцов не оказалось вариантов Alpha, Beta и Gamma. По нашим данным, полученным при проведении фрагментного секвенирования в рамках генетического мониторинга штаммов, в Омской области было

зарегистрировано 5 случаев варианта Alpha (первый 18.03.2021, последний 09.06.2021) и лишь 1 случай варианта Beta (13.05.2021), вариант Gamma не был выявлен (принадлежность вируса к вариантам определяли по набору мутаций в полученных последовательностях фрагментов S-белка).

Таблица 2. Мутации в RBD-кодирующей области S-белка образцов вируса SARS-CoV-2 (первичных и культуральных, n = 222), собранных в Омской области в период 2020–2022 гг., и проявление их в линиях Pango v.4.1.1. В скобках указана принадлежность линии к варианту VOC (Delta или Omicron)
Table 2. Mutations in the RBD-coding region of the S-protein of SARS-CoV-2 virus samples (primary and cultural, n = 222) collected in the Omsk region in the period 2020–2022, and their manifestation in Pango lineages v.4.1.1. The parentheses indicate that the lineage belongs to the VOC variant (Delta or Omicron)

Исходная аминокислота Original amino acid	Позиция в S-белке Position in the S-protein	Мутация Mutation	Проявление в линиях Pango Manifestation in Pango lineages v.4.1.1
G	339	D	BA.1 (Omicron), BA.1.1 (Omicron)
R	346	K	BA.1 (Omicron), BA.1.1 (Omicron)
V	367	I	AY.122 (Delta)
L	368	I	B.1.617.2 (Delta)
S	371	L	BA.1 (Omicron), BA.1.1 (Omicron)
S	373	P	BA.1 (Omicron), BA.1.1 (Omicron)
S	375	F	BA.1 (Omicron), BA.1.1 (Omicron)
K	417	N	BA.1 (Omicron), BA.1.1 (Omicron)
N	440	K	BA.1 (Omicron), BA.1.1 (Omicron), BA.1.15 (Omicron), BA.2 (Omicron)
G	446	S	BA.1 (Omicron), BA.1.1 (Omicron), BA.1.15 (Omicron)
L	452	R	AY.122 (Delta), B.1.617.2 (Delta)
S	477	N	BA.1 (Omicron), BA.1.1 (Omicron), BA.1.15 (Omicron), BA.2 (Omicron)
T	478	K	AY.122 (Delta), B.1.617.2 (Delta), BA.1 (Omicron), BA.1.1 (Omicron), BA.1.15 (Omicron), BA.2 (Omicron)
E	484	A	BA.1 (Omicron), BA.1.1 (Omicron), BA.1.15 (Omicron), BA.2 (Omicron)
E	484	K	B.1.1, AT.1, B.1.1.370
Q	493	R	BA.1 (Omicron), BA.1.1 (Omicron), BA.1.15 (Omicron), BA.2 (Omicron)
G	496	S	BA.1 (Omicron), BA.1.1 (Omicron), BA.1.15 (Omicron)
Q	498	R	BA.1 (Omicron), BA.1.1 (Omicron), BA.1.15 (Omicron), BA.2 (Omicron)
N	501	Y	BA.1 (Omicron), BA.1.1 (Omicron), BA.1.15 (Omicron), BA.2 (Omicron)
Y	505	H	BA.1 (Omicron), BA.1.1 (Omicron), BA.1.15 (Omicron), BA.2 (Omicron)

Кроме того, в базе данных GISAID есть только единственный геном варианта Alpha из Омска (EPI_ISL_3932098), однако эпидемиологический анамнез по данному образцу неизвестен, а геномы вариантов Beta и Gamma вовсе отсутствуют. Вероятно, эти варианты не получили здесь распространения, представляя только завозные случаи.

Также представляет интерес факт, что в Омской области выявлялись линии, геномы которых (по данным GISAID) встречались достаточно редко. Так, например, линия B.1.1.506 насчитывает 24 образца, из которых 22 представлены в России,

и 17 – непосредственно в Омской области, линия B.1.1.184, к которой в базе GISAID относятся 17 геномов, среди них 15 – российские, и 7 – омские. Некоторые линии, выявленные в Омской области, были обнаружены только в России: B.1.1.121, B.1.1.31, B.1.1.396. По всей видимости, это обусловлено эволюционными изменениями вируса и его приспособлением к восприимчивому организму на конкретной территории.

Более четкое распределение геномов по субтипам выражено в основном при детальном анализе части S-гена, кодирующей RBD, что связано

с возникновением новых вариантов благодаря изменениям преимущественно именно в этой области и ещё раз подтверждает опубликованные данные [7]. Отсутствие значимых различий по области генома, кодирующей белки E и M, обусловлено, очевидно, тем, что эти области считаются консервативными в отличие от областей гена N и наиболее неконсервативного гена S [6]. В нашем исследовании различий по гену N также не было выявлено, что, возможно, связано с особенностями выборки. Очевидно также, что для полноценного анализа изменений SARS-CoV-2 необходимы данные полных геномов.

Преобладание несинонимичных замен в последовательностях S-белка говорит о положительном действии отбора (прежде всего – взаимодействие с иммунной системой хозяина), а сконцентрированность их в области RBD влечёт за собой появление значимых при выявлении новых вариантов SARS-CoV-2 мутаций.

Проявление большей части мутаций в линиях варианта Omicron обуславливает высокую контагиозность и распространённость вируса и объясняет его принадлежность к вариантам с высоким эпидемиологическим потенциалом, относящимся к VOC [21]. Наличие в омских геномах редких мутаций связано, вероятно, как и встречаемость редких линий, с изменениями вируса и особенностями его циркуляции на конкретной территории.

Высокий уровень гомологии (> 99%) между отдельными вариантами вируса SARS-CoV-2 свидетельствует об их непосредственной связи и общности происхождения, а также о только начинающейся эволюции вируса.

Закключение

В результате проделанной работы по полученным молекулярно-генетическим данным были определены линии SARS-CoV-2, циркулирующие в Омской области в разное время (период 2020–2022 гг.).

Опираясь на полученную информацию, можно ориентировочно судить о времени появления того или иного варианта, а также о его закреплении в популяции и дальнейшем распространении. Кроме того, можно наблюдать циркуляцию некоторых редких линий, которые были обнаружены в большинстве случаев именно в Омской области. Однако, чтобы говорить о значимых географически

привязанных изменениях генома SARS-CoV-2, выявленных или, возможно, возникших в Омской области, полученных данных недостаточно.

По филогенетическому анализу видно, что варианты вируса, циркулирующие в области, группируются в один кластер с идентичными вариантами из других областей или стран. Более выраженную внутрикластерную дифференцировку линий можно наблюдать при анализе области RBD генома вируса SARS-CoV-2, несмотря на то, что вирусы разных вариантов гомологичны по отношению к друг другу. Проведённый анализ указывает также, что ввиду продолжающейся эволюции SARS-CoV-2 необходимо тщательно изучать отдельные мутации, являющиеся нетипичными для какого-либо генетического варианта вируса, которые, возможно, могут свидетельствовать о территориально связанных изменениях вируса и иметь эпидемиологическую значимость. Кроме того, необходимо уделять особое внимание изучению геномного участка возникновения мутаций.

Ориентируясь на полученные данные, можно сказать, что ситуация по COVID-19 в Омской области в целом совпадает с таковой во всей стране и мире. Это определяется логистическими цепочками, способствующим распространению и циркуляции какого-либо варианта вируса по всем континентам. Однако это не исключает параллельного возникновения определённых мутаций на отдалённых друг от друга территориях.

Таким образом, очевидно, что необходим систематический мониторинг SARS-CoV-2, а также обмен информацией о вирусе, заболеваемости и течении болезни. Это позволит расширить знания о патогене, углубить понимание его экологических особенностей, своевременно выявлять новые варианты вируса и проводить оценку их риска для здоровья населения.

Кроме того, необходимо уделять внимание изучению циркулирующих линий вируса на отдельно взятых территориях, что, возможно, даст более детальное понимание механизмов его эволюции и распространения.

Продолжение и дальнейшее развитие молекулярно-генетического мониторинга SARS-CoV-2 поможет не только контролировать эпидемиологическую ситуацию по этой инфекции, но и способствовать эпидемиологическому прогнозированию в будущем.

Литература

1. Wu F., Zhao S., Yu B., et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020. Vol. 579. P. 265–269. DOI: 10.1038/s41586-020-2008-3.
2. World Health Organization. Novel Coronavirus (2019-nCoV) Situation Report – 11. 31 January 2020. Доступно по: <https://www.who.int/docs/default-source/coronavirus/situation-reports/20200131-sitrep-11-ncov.pdf>. Ссылка активна на 27 июня 2022.
3. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 – 11 March 2020. 11 March 2020. Доступно по: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>. Ссылка активна на 27 июня 2022.
4. Chinese SARS Molecular Epidemiology Consortium. Molecular evolution of the SARS coronavirus during the course of the SARS epidemic in China // *Science*. 2004. Vol. 303, N5664. P. 1666–1669. DOI: 10.1126/science.1092002.
5. Lamers M.M., Raj V.S., Shafei M., et al. Deletion variants of Middle East respiratory syndrome coronavirus from humans, Jordan, 2015 // *Emerg. Infect. Dis.* 2016. Vol. 22, N4. P. 716–719. DOI: 10.3201/eid2204.152065.
6. Wang R., Hozumi Y., Yin C., et al. Decoding SARS-CoV-2 transmission and evolution and ramifications for COVID-19 diagnosis, vaccine, and medicine // *J. Chem. Inf. Model.* 2020. Vol. 60, N12. P. 5853–5865. DOI: 10.1021/acs.jcim.0c00501.
7. Chen J., Wang R., Wang M., et al. Mutations strengthened SARS-CoV-2 infectivity // *J. Mol. Biol.* 2020. Vol. 432, N19. P. 5212–5226. DOI: 10.1016/j.jmb.2020.07.009.

8. Li X., Wang W., Zhao X., et al. Transmission dynamics and evolutionary history of 2019-nCoV // *J. Med. Virol.* 2020. Vol. 92, N5. P. 501–511. DOI: 10.1002/jmv.25701.
9. Shu Y., McCauley J. GISAID: Global initiative on sharing all influenza data – from vision to reality // *Eurosurveillance.* 2017. Vol. 22, N13. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.13.30494.
10. Временные рекомендации Роспотребнадзора от 21 января 2020 года № 02/706-2020-27 по лабораторной диагностике новой коронавирусной инфекции, вызванной 2019-nCoV, Приложение 2. Доступно по: https://www.rosпотребнадзор.ru/region/korono_virus/files/spec/vrem%20rekom.pdf. Ссылка активна на 27 июня 2022.
11. Diseases CFEV. Protocol for specific RT-PCRs for marker regions of the Spike region indicative of the UK SARS-CoV2 variant B.1.1.7 and the South African variant 501Y.V2. 2020. Доступно по: https://www.hug.ch/sites/interhug/files/structures/laboratoire_de_virologie/protocol_amplification_voc_20201201_uk_geneva.pdf. Ссылка активна на 06.02.2021.
12. Li H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences // *Bioinformatics.* 2018. Vol. 34, N18. P. 3094–3100. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty191.
13. Li H., Handsaker B., Wysoker A., et al. The Sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools // *Bioinformatics.* 2009. Vol. 25, N16. P. 2078–2079. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp352.
14. Grubaugh N.D., Gangavarapu K., Quick J., et al. An amplicon-based sequencing framework for accurately measuring intrahost virus diversity using PrimalSeq and iVar // *Genome Biol.* 2019. Vol. 20, N8. DOI: 10.1186/s13059-018-1618-7.
15. Li H. Aligning Sequence Reads, Clone Sequences and Assembly Contigs with BWA-MEM // *ArXiv.* 2013. Vol. 1303. DOI: 10.48550/arXiv.1303.3997.
16. Wilm A., Aw P.P., Bertrand D., et al. LoFreq: a sequence-quality aware, ultra-sensitive variant caller for uncovering cell-population heterogeneity from high-throughput sequencing datasets // *Nucleic Acids Res.* 2012. Vol. 40, N22. P. 11189–11201. DOI: 10.1093/nar/gks918.
17. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., the UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // *Bioinformatics.* 2012. Vol. 28, N8. P. 1166–1167. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts091.
18. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets // *Molecular Biology and Evolution.* 2016. Vol. 33, N7. P. 1870–1874. DOI: 10.1093/molbev/msw054.
19. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 1999. Vol. 41. P. 95–98.
20. Mlcochova P., Kemp S.A., Dhar M.S., et al. SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant replication and immune evasion. *Nature.* 2021. Vol. 599. P. 114–119. DOI: 10.1038/s41586-021-03944-y.
21. Ren S. Y., Wang W. B., Gao R. D., et al. Omicron variant (B.1.1.529) of SARS-CoV-2: Mutation, infectivity, transmission, and vaccine resistance // *World journal of clinical cases.* 2022. Vol. 10, N1. P. 1–11. DOI: 10.12998/wjcc.v10.i1.1.

References

1. Wu F., Zhao S., Yu B., et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature.* 2020;579:265–9. DOI: 10.1038/s41586-020-2008-3.
2. World Health Organization. Novel Coronavirus (2019-nCoV) Situation Report – 11. 31 January 2020. Available at: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200131-sitrep-11-ncov.pdf>. Accessed: 27 Jun 2022.
3. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 – 11 March 2020. 11 March 2020. Available at: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>. Accessed: 27 Jun 2022.
4. Chinese SARS Molecular Epidemiology Consortium. Molecular evolution of the SARS coronavirus during the course of the SARS epidemic in China. *Science.* 2004;303(5664):1666–9. DOI: 10.1126/science.1092002.
5. Lamers MM, Raj VS, Shafei M, et al. Deletion variants of Middle East respiratory syndrome coronavirus from humans, Jordan, 2015. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(4):716–9. DOI: 10.3201/eid2204.152065.
6. Wang R, Hozumi Y, Yin C, et al. Decoding SARS-CoV-2 transmission and evolution and ramifications for COVID-19 diagnosis, vaccine, and medicine. *J Chem Inf Model.* 2020;60(12):5853–65. DOI: 10.1021/acs.jcim.0c00501.
7. Chen J, Wang R, Wang M, et al. Mutations strengthened SARS-CoV-2 infectivity. *J Mol Biol.* 2020;432(19):5212–26. DOI: 10.1016/j.jmb.2020.07.009.
8. Li X., Wang W., Zhao X., et al. Chaillon. Transmission dynamics and evolutionary history of 2019-nCoV. *J Med Virol.* 2020;92(5):501–11. DOI: 10.1002/jmv.25701.
9. Shu Y., McCauley J. GISAID: Global initiative on sharing all influenza data – from vision to reality. *Eurosurveillance.* 2017;22(13). DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.13.30494.
10. Временные рекомендации Роспотребнадзора от 21 января 2020 года № 02/706-2020-27 по лабораторной диагностике новой коронавирусной инфекции, вызванной 2019-nCoV, Приложение 2. Доступно по: https://www.rosпотребнадзор.ru/region/korono_virus/files/spec/vrem%20rekom.pdf. Accessed: 27 Jun 2022.
11. Diseases CFEV. Protocol for specific RT-PCRs for marker regions of the Spike region indicative of the UK SARS-CoV2 variant B.1.1.7 and the South African variant 501Y.V2. 2020. Available at: https://www.hug.ch/sites/interhug/files/structures/laboratoire_de_virologie/protocol_amplification_voc_20201201_uk_geneva.pdf. Accessed: 06.02.2021.
12. Li H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics.* 2018;34(18):3094–100. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty191.
13. Li H., Handsaker B., Wysoker A., et al. The Sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25(16):2078–9. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp352.
14. Grubaugh ND, Gangavarapu K, Quick J, et al. An amplicon-based sequencing framework for accurately measuring intrahost virus diversity using PrimalSeq and iVar. *Genome Biol.* 2019;20(8). DOI: 10.1186/s13059-018-1618-7.
15. Li H. Aligning Sequence Reads, Clone Sequences and Assembly Contigs with BWA-MEM. *ArXiv.* 2013;1303. DOI: 10.48550/arXiv.1303.3997.
16. Wilm A., Aw P.P., Bertrand D., et al. LoFreq: a sequence-quality aware, ultra-sensitive variant caller for uncovering cell-population heterogeneity from high-throughput sequencing datasets. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(22):11189–201. DOI: 10.1093/nar/gks918.
17. Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, the UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics.* 2012;28(8):1166–7. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts091.
18. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution.* 2016;33(7):1870–4. DOI: 10.1093/molbev/msw054.
19. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 1999;41:95–8.
20. Mlcochova P, Kemp SA, Dhar MS, et al. SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant replication and immune evasion. *Nature.* 2021;599:114–119. DOI: 10.1038/s41586-021-03944-y.
21. Ren SY, Wang WB, Gao RD, et al. Omicron variant (B.1.1.529) of SARS-CoV-2: Mutation, infectivity, transmission, and vaccine resistance. *World journal of clinical cases.* 2022;10(1):1–11. DOI: 10.12998/wjcc.v10.i1.1.

Об авторах

- **Екатерина Алексеевна Градобоева** – младший научный сотрудник, ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора. +7 (908) 805-45-08, Gradoboeva_EA@oniipi.org. 0000-0002-2046-9872.
- **Жанна Сергеевна Тюлько** – старший научный сотрудник, ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора; доцент, ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России. +7 (913) 147-21-14, tjs@omsk-osma.ru. 0000-0001-8536-0520.
- **Артем Викторович Фадеев** – старший научный сотрудник, ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России. +7 (952) 249-68-21, afadeew@gmail.com. 0000-0003-3558-3261.
- **Алексей Геннадьевич Василенко** – научный сотрудник, врач-эпидемиолог, ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора. +7 (923) 687-77-38, Vasilenko_AG@oniipi.org. 0000-0002-2754-6359.
- **Валерий Викторович Якименко** – заведующий лабораторией, главный научный сотрудник, ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора. +7 (905) 099-44-89, Yakimenko_VV@oniipi.org. 0000-0001-9088-3668.

Поступила: 28.09.2022. Принята к печати: 20.11.2022.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

About the Authors

- **Ekatereina A. Gradoboeva** – junior researcher, Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, Rospotrebnadzor. +7 (908) 805-45-08, Gradoboeva_EA@oniipi.org. 0000-0002-2046-9872.
- **Zhanna S. Tyulko** – senior researcher, Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, Rospotrebnadzor; associate professor of Omsk State Medical University of Ministry of Health of the Russian Federation. +7 (913) 147-2114, tjs@omsk-osma.ru. 0000-0001-8536-0520.
- **Artem V. Fadeev** – senior researcher, Smorodintsev Research Influenza Institute of Ministry of Health of the Russian Federation. +7 (952) 249-68-21, afadeew@gmail.com. 0000-0003-3558-3261.
- **Aleksei G. Vasilenko** – researcher, epidemiologist, Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, Rospotrebnadzor. +7 (923) 687-77-38, Vasilenko_AG@oniipi.org. 0000-0002-2754-6359.
- **Valery V. Yakimenko** – head of laboratory, chief researcher, Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, Rospotrebnadzor. +7 (905) 099-44-89, Yakimenko_VV@oniipi.org. 0000-0001-9088-3668.

Received: 28.09.2022. Accepted: 20.11.2022.

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.