

[DOI:10.26104/NNTIK.2023.28.28.009](https://doi.org/10.26104/NNTIK.2023.28.28.009)

*Бисенбаева К.Б., Усенгазиева Г.С., Мырзахметова Б.Ш.,
Жаппарова Г.А., Кутумбетов Л.Б.*

**COVID-19 КОРОНАВИРУС ИНФЕКЦИЯСЫНЫН SARS-COV-2
ДЕЛЬТА ИНДИЯ ВАРИАНТЫН ИЗИЛДӨӨ**

*Бисенбаева К.Б., Усенгазиева Г.С., Мырзахметова Б.Ш.,
Жаппарова Г.А., Кутумбетов Л.Б.*

**ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ
ДЕЛЬТА-ИНДИЙСКОГО ВАРИАНТА SARS-COV-2 КОРОНАВИРУСНОЙ
ИНФЕКЦИЙ COVID-19**

*K. Beysenbayeva, G. Usengazieva, B. Murzakhmetova,
G. Zhapparova, L. Kutumbetov*

**THE STUDY OF THE CULTURAL PROPERTIES
OF THE DELTA-INDIAN VARIANTS OF SARS-COV-2 CORONAVIRUS
INFECTIONS COVID-19**

УДК: 578.7

Макалада COVID-19 коронавирусу SARS-CoV-2 вирусунун дельта-Индиялык вариантынын культуралык касиеттерин изилдөө боюнча иштердин жыйынтыктары берилген. 2019-жылдын декабрь айында Кытайдын Ухань шаарында (Хубэй провинциясы) жаңы коронавирустук инфекциянын чыгышы катталган. 2020-жылдын 11-февралында Бүткүл дүйнөлүк саламаттыкты сактоо уюму жаңы коронавирус себеп болгон инфекциянын расмий аталышын аныктады – COVID-19 («Коронавирус оорусу 2019»). 2020-жылдын 11-февралында Вирус-тардын таксономиясы боюнча эл аралык комитет инфекциялык агентти SARS-CoV-2 расмий аталышын ыйгарган. Бүгүнкү күндө дүйнөдө 418 миллиондон ашык COVID-19 учуру катталды, анын 5,9 миллиону өлүмгө дуушар болушту. Дүйнөдө SARS-CoV-2 вирусунун жаңы генетикалык дельта вариантынын жайылышынын натыйжасында күнүнө аныкталган учурлардын саны тездик менен өсүп жатат, 2022-жылдын башында алардын саны 15 миллиондон ашкан.

Негизги сөздөр: коронавирус, SARS-CoV-2, дельта варианты, вирусстар, культура, пассаж, изилдөө, ооруу, инфекция, цитопатология, мутация.

В данной работе представлены результаты работ по изучению культуральных свойств дельта-индийского варианта вируса SARS-CoV-2 коронавирусной инфекций COVID-19. В конце 2019 г. в Китае произошла вспышка новой коронавирусной инфекции с эпицентром в городе Ухань (провинция Хубэй). Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) 11 февраля 2020 г. определила официальное название инфекции, вызванной новым коронавирусом, COVID-19 («Coronavirus disease 2019»). Международный комитет по таксономии вирусов 11 февраля 2020 г. присвоил официальное название возбудителю инфекции – SARS-CoV-2. На сегодняшний день в мире зарегистрировано более 418 млн случаев COVID-19, из них 5,9 млн – с летальным исходом. В мире число заболевших, выявленных за сутки, стремительно растет в результате распространения нового генетического дельта-варианта вируса SARS-CoV-2, на начало 2022 г. их число превысило 15 млн.

Ключевые слова: коронавирус, SARS-CoV-2, дельта-вариант, вирус, культивирования, пассаж, изучение, заболевание, инфекция, цитопатология.

This paper presents the results of studies on the cultural pro-

erties of the delta-Indian variant of the SARS-CoV-2 virus of the COVID-19 coronavirus infection. At the end of 2019, an outbreak of a new coronavirus infection occurred in China with its epicenter in the city of Wuhan (Hubei Province). On February 11, 2020, the World Health Organization (WHO) determined the official name of the infection caused by the new coronavirus – COVID-19 (“Coronavirus disease 2019”). On February 11, 2020, the International Committee on Taxonomy of Viruses assigned the official name of the infectious agent - SARS-CoV-2. To date, more than 418 million cases of COVID-19 have been registered in the world, of which 5.9 million are fatal. In the world, the number of cases detected per day is growing rapidly as a result of the spread of a new genetic delta variant of the SARS-CoV-2 virus; at the beginning of 2022, their number exceeded 15 million.

Key words: coronavirus, SARS-CoV-2, delta option, virus, cultivation, passage, study, disease, infection, cytopathology.

Введение. В конце 2019 г. в Китайской Народной Республике (КНР) произошла вспышка новой коронавирусной инфекции с эпицентром в городе Ухань (провинция Хубэй). Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) 11 февраля 2020 г. определила официальное название инфекции, вызванной новым коронавирусом, – COVID-19 («Coronavirus disease 2019») [1]. Международный комитет по таксономии вирусов 11 февраля 2020 г. присвоил официальное название возбудителю инфекции – SARS-CoV-2 [2].

На сегодняшний день в мире зарегистрировано более 418 млн случаев COVID-19, из них 5,9 млн – с летальным исходом. В мире число заболевших, выявленных за сутки, стремительно растет в результате распространения нового генетического дельта-варианта вируса SARS-CoV-2, на начало 2022 г. их число превысило 15 млн [3].

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 [4].

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

Согласно данным системы отслеживания вариантов SARS-CoV-2 Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), впервые дельта-вариант SARS-CoV-2 (B.1.617.2) был выявлен в октябре 2020 года в Индии [7,8].

По состоянию на 15 июня 2021 г. этот вариант зарегистрирован в 80 странах и продолжает быстро распространяться во многих регионах мира [9,10].

Согласно информации Министерства здравоохранения РК, дельта-вариант SARS-CoV-2 обладает высокой контагиозностью и на 60% заразнее других вариантов коронавируса SARS-CoV-2, в среднем от 1 человека инфицируется 5-6 человек, тогда как от циркулируемых штаммов 3-4 человека. Он отличается более коротким инкубационным периодом – продолжительностью до 7 дней [11].

Некоторыми общими симптомами дельта-варианта являются лихорадка, кашель, одышка, рвота, диарея, боль в горле и головная боль [12,13]. Другие симптомы включают: миалгии, потерю вкуса, обоняния, усталость и ринорею [14]. В настоящее время исследования показывают, что симптомы дельта-варианта и альфа-варианта схожи, но пациенты с дельта-вариантом быстрее заболевают и повышают вирусную нагрузку в дыхательных путях. Исследования, проведенные в Великобритании, показали, что дельта-вариант однозначно вызывает нарушение слуха и гангрену из-за более сильных сгустков крови, в то время как реже вызывает кашель и потерю обоняния [15,16]. Необходимы дополнительные исследования и отчеты о случаях, чтобы задокументировать, действительно ли дельта-вариант вызывает симптомы, отличные от альфа-варианта, чтобы прояснить противоречивые сообщения. Дельта-вариант – это очень заразный вариант COVID-19. Органы здравоохранения особенно обеспокоены этим заболеванием, поскольку оно, по-видимому, более заразно, чем другие варианты, более устойчиво к здоровому контролю и профилактике, таким как изоляция, вызывает более разнообразные и тяжелые симптомы у пациентов, легче

распространяется среди детей [17].

Вероятность мутации вируса повышается, когда он широко циркулирует среди населения и заражает большое количество людей. Чем больше возможностей у вируса для распространения, тем чаще он реплицируется и тем больше у него шансов на изменение. В большинстве случаев мутации практически не влияют на способность вируса заражать людей и вызывать заболевание. Но в зависимости от того, в каком генетическом материале вируса произошли изменения, они могут повлиять на такие биологические свойства вируса, как контагиозность и патогенность [18]. В связи с чем резюмируя вышеизложенное данная работа посвящена изучению культуральных свойств вируса варианта «Дельта» SARS-CoV-2.

Целью настоящей работы являлось изучение культуральных свойств дельта-индийского варианта вируса SARS-CoV-2 коронавирусной инфекцией COVID-19.

Материалы методы. *Культура клеток.* В работе были использованы первичные и перевиваемые линии культур клеток различного происхождения (табл. 1), которые выращивали в соответствующих питательных средах с содержанием 10% фетальной сыворотки крови крупного рогатого скота (КРС).

Выделение и культивирование вируса SARS-CoV-2. Для выделения вируса использовали клинические образцы от больных коронавирусной инфекцией COVID-19. Выделение вируса проводили в монослойной культуре клеток Vero, используя в качестве поддерживающей среды DMEM с содержанием 2% FBS. Наличие вируса устанавливали по ЦПД в культуре клеток. Специфичность цитопатологии и идентификацию вируса подтверждали в ПЦР и реакции нейтрализации.

Выделение изолятов вируса. Образцы носоглоточных смывов, полученные от больных COVID-19, осветляли центрифугированием, фильтровали через насадки Millex с диаметром пор 0,22 мкм (Merck Millipore, США) и высевали на монослой культуры клеток Vero, выращенных в культуральных флаконах площадью поверхности 25 см² (Corning, США). Инкубацию инфицированных культур клеток проводили при температуре 37°C в течение 5 суток или до появления цитопатического действия вирусов (ЦПД).

Результаты исследований. Вирус выделяли из 3 клинических образцов (мазки-смывы слизистой оболочки носовой полости) с вероятным содержанием варианта «Дельта» индийского происхождения, носоглоточных смывов был выявлен в образцах, собранных в г. Шымкент.

Для выделения вируса использовали культуру клеток Vero приготовленной монослоем в матрасах (25 см²) путем выращивания в питательной среде DMEM с добавлением 10% фетальной сыворотки кро-

ви крупного рогатого скота.

На монослой культуры клеток Vero, наносили суспензию смывов слизистой оболочки носовой полости больных в объеме 0,5 мл и выдерживали в течение 60 минут при температуре 37 °С. Затем инокулят удаляли, монослой промывали три раза с неполной питательной средой DMEM и вносили поддерживающую среду с 2% фетальной сывороткой крови крупного рогатого скота и продолжали культивирование при температуре 37 °С с ежедневной микроскопией. Наличие вируса устанавливали по цитопатогенному действию в культуре клеток. Титр вируса определяли титрованием в аналогичной культуре клеток, приготовленной в 96%-луночных планшетах. Титр рассчитывали по Риду и Менча. Выделенный вирус идентифицировали в реакции нейтрализации с использованием сыворотки крови, полученной на Индийский вариант вируса SARS-CoV-2 путем иммунизации интактных сирийских хомяков.

Генетическая идентификация варианта вируса проводилась в специализированной лаборатории коллективного пользования.

После последовательных слепых трех пассажей цитопатологическое действие вируса обнаружено в

одном образце.

Ежедневная микроскопия монослоя культуры клеток, инфицированной клиническими образцами, показало, что на вторые сутки после заражения появились некоторые изменения морфологии отдельных клеток в монослое. Выраженное цитопатическое действие (ЦПД) вируса проявлялось на 3 сутки культивирования в виде округления клеток резко преломляющих свет, а в следующие два дня количество таких клеток резко увеличивалось, и они массово отторгались от поверхности адгезии и без разрушения, сохраняя свою целостность, плавали в культуральной суспензии в виде шариков. Полное разрушение монослоя посредством отслоения пораженных клеток наступала на 2-3 сутки после появления признаков цитопатологии.

В последующих пассажах характер ЦПД оставался таким же, как и на первом пассаже при выделении. Титр вируса 5-го пассажа в культуре клеток Vero составил $10^{7,25}$ ТЦД_{50/см³}.

В реакции нейтрализации выделенный изолят вируса полностью нейтрализовался с помощью сыворотки крови, содержащей специфические антитела на вирус SARS-CoV-2, а исследования генома показало, что возбудитель относится к варианту «Дельта».

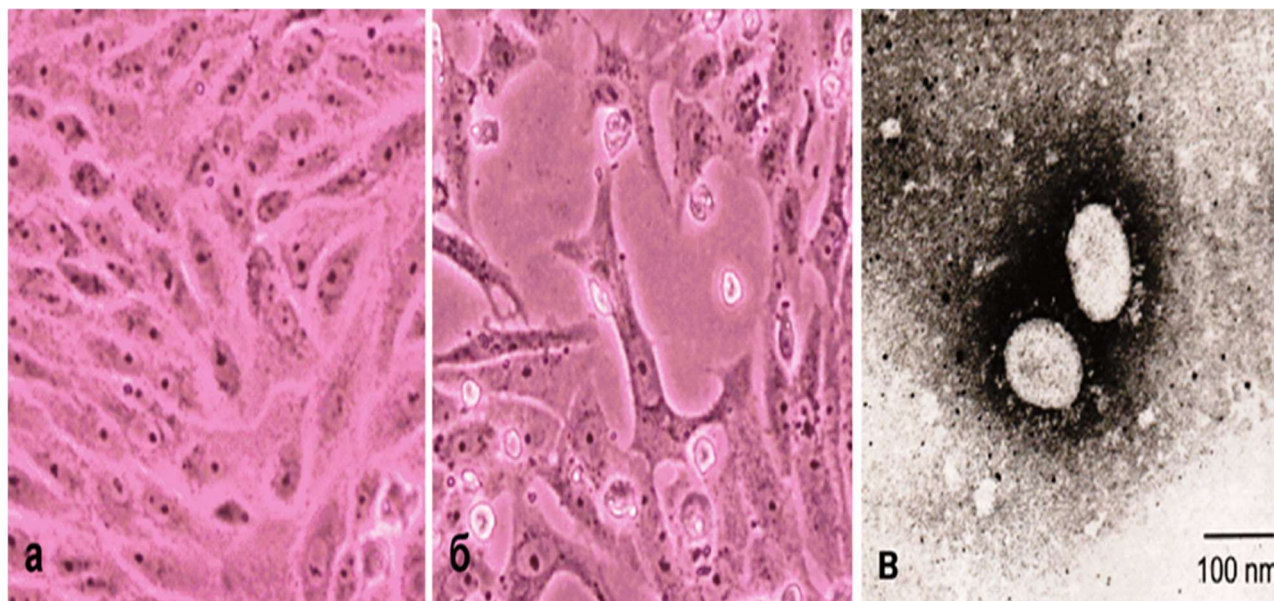


Рис. 1. Подбор культур клеток, чувствительных к варианту «Индийский-Дельта» вирусу SARS-CoV-2.

Примечание: а – неинфицированная культура клеток Vero, б – монослой культуры клеток Vero на 4 день после заражения вирусом SARS-CoV-2, в – электронная фотография вируса.

Определение динамики репродукции варианта «Дельта» вируса SARS-CoV-2 в чувствительной культуре клеток. В исследованиях были использованы 11 различных культур клеток первичного и перевиваемого происхождения. Результаты оценки чувствительности этих культур клеток к варианту «Дельта» вируса SARS-CoV-2 приведены в таблице 1.

Чувствительность разных культур клеток к варианту «Дельта» вируса SARS-CoV-2

Критерии оценки чувствительности культур клеток к вирусу					
Наименование культуры клеток	Пассажный уровень вируса	Время появления ЦПД вируса, ч	Сроки культивирования вируса, сут	Площадь поражения клеточного монослоя перед сбором вируса, %	Титр вируса в культуре клеток Vero, lg ТЦД 50/см ³ (X±m)
Vero	1	48	5	60-70	3.16±0.30
	2	48	4	60-70	4.41±0.22
	3	36-48	4	75-80	5.66±0.22
СПЭВ	1	48-50	5	60-70	4.91±0.08
	2	48-50	4	60-70	5.33±0.16
	3	48-50	3	75-80	5.58±0.08
PK-15	1	48-50	5	60-70	5.66±0.22
	2	48-50	4	60-70	5.66±0.08
	3	48-50	3	75-80	5.33±0.16
MARC-145	1	48-50	5	60-70	3.91±0.22
	2	48-50	4	70-80	4.41±0.08
	3	48-50	3	80-90	4.50±0.25
MA-104	1	48-50	4	60-70	4.08±0.22
	2	48-50	4	70-80	4.50±0.08
	3	48-50	3	80-90	4.25±0.14
МДСК	1	120-144	7	10-20	0.58±0.08
	2	120-144	6	10-20	0.41±0.16
	3	120-144	6	10-20	0.83±0.16
RK-13	1	120-144	7	10-20	0.58±0.08
	2	120-144	6	10-20	0.58±0.08
	3	120-140	6	50-60	0.83±0.08
ТЯ	1	120-144	7	10-15	0.16±0.08
	2	120-144	6	10-15	0.16±0.08
	3	120-144	6	15-20	0.50±0.14
ПЩ	1	н/о	7	н/о	0.16±0.08
	2	н/о	6	н/о	0.08±0.08
	3	н/о	6	н/о	0.00
ВНК-21	1	н/о	7	н/о	0.91±0.08
	2	н/о	6	н/о	0.75±0.14
	3	н/о	6	н/о	0.08±0.08
CRFK	1	48-50	6	10-15	0.08±0.08
	2	48-50	6	10-15	0.00
	3	н/о	6	н/о	0.00

Как видно из данных таблицы 1, из 11 испытанных культур клеток наиболее чувствительными к варианту «Индийский-Дельта» вирусу SARS-CoV-2 оказались культуры клеток MA-104, MARC-145, PK-15, СПЭВ, Vero в которых ЦПД вируса проявлялось через 24-48 ч и на 3-5 сут. оно развивалось по всему монослою, поражая до 70-80% клеток. Титр вируса в этих культурах клеток колебался пределах 3,16-5,66 lg ТЦД50/см³. Адаптация вируса в культуре клеток Vero происходила более быстро, нежели в других чувствительных клеточных линиях. Культуры клеток МДСК, RK-13, ТЯ, ПЩ, ВНК-21, CRFK оказались менее или полностью не чувствительными к испытываемому вирусу.

Обсуждение. С момента выявления вируса SARS-CoV-2 в декабре 2019 г., вызвавшего в 2020 г. пандемию COVID-19, получен значительный массив данных о генетической эволюции возбудителя в ходе пандемии. В ходе приспособления вируса SARS-CoV-2 к новому хозяину появилось большое количество

вариантов генома, отличающихся от исходного вируса определенным количеством нуклеотидных замен.

Дельта-вариант (B.1.617.2) был впервые обнаружен в октябре 2020 г. в Индии и 11 мая 2021 г. был охарактеризован ВОЗ как вызывающий озабоченность вариант (VOC), появление новых вариантов SARS-CoV-2 вызывает серьезную озабоченность во всем мире, так как новые линии потенциально могут иметь более высокую трансмиссивность, влиять на длительность и тяжесть заболевания, снижать эффективность вакцин, увеличивать показатели смертности [19].

О дельте-варианте было сообщено в 80 странах. В настоящее время это наиболее распространенный вариант в Индии и Великобритании, где на его долю приходится более 90% случаев. Дельта была впервые выявлена в Соединенных Штатах в марте. Хотя Альфа остается здесь наиболее распространенным вариантом, Дельта быстро распространилась. В начале апреля 2021 года Дельта составила всего 0,1% случаев в Соединенных Штатах, согласно CDC. К началу мая на

долю Дельты приходилось 1,3% случаев, а к началу июня этот показатель подскочил до 9,5%. В 2021 году оценка достигла 20.6% [20].

Вариант SARS-CoV-2, вызывающий озабоченность В.1.617.2, вытеснил В.1.1.7 в качестве доминирующего варианта в Англии и других странах. Исследование также проводилось для определения того, является ли В.1.617.2 также вытеснял В.1.1.7 в Соединенных Штатах. Проанализировали результаты ПЦР-тестирования и результаты вирусного секвенирования образцов, собранных по всей территории Соединенных Штатов, и показали, что В.1.1.7 быстро перемещался и больше не несет ответственности за большинство новых случаев. Процент положительных случаев SARS-CoV-2, которые являются В.1.1.7, снизился с 70% в апреле 2021 года до 42% всего за 6 недель. Анализ показал быстрый рост вариантов В.1.617.2 и P.1 в качестве основных факторов этого смещения. В настоящее время темпы роста В.1.617.2 были выше, чем P.1 в США (0,61 против 0,22), что согласуется с отчетами из других стран. Наконец, отчеты показали, что В.1.617.2 растет быстрее в странах с более низким уровнем вакцинации [21, 22].

Выводы. Таким образом, в Республике Казахстан от больного человека выделен *in vitro* вирус SARS-CoV-2 индийского варианта «Delta» (SARS-CoV-2/Indian-Delta/KZ Almaty/07.2021) коронавирусной инфекции COVID-19, который обладает цитопатогенностью в культуре клеток Vero, накапливающийся в титре до $10^{7.25}$ ТЦД_{50/см³ на пятом пассаже.}

Изучена чувствительность различных клеточных культур к вирусу SARS-CoV-2, и установлено, что клеточные линии, происходящие из почек обезьян (Vero, MARC-145, Ma-104) и свиней (PK-15, СПЭВ) являются наиболее чувствительными к данному возбудителю. Вирус в указанных культурах клеток репродуцируется с развитием ЦПД и накапливается в титрах от 3,16 до 5,66 lg ТЦД_{50/мл} в первоначальных трех пассажах, а последующих, проведенных в культуре клеток Vero, от 6,00 lg ТЦД_{50/мл} и выше.

Литература:

1. Временные методические рекомендации (профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции COVID-19).
2. Rambaut A. et al. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist Genomic Epidemiology. *Nat Microbiol* 5, 1403–1407 (2020).
3. World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) dashboard. (Cited 18 Feb 2022). [Internet]. Available from: <https://covid19.who.int>.
4. Shiliaev N., Lukash T., Palchevska O., Crossman D.K., Green T.J., Crowley M.R., Frolova E.I., Frolov I. Natural and recombinant SARS-CoV-2 isolates rapidly evolve *in vitro* to higher infectivity through more efficient binding to heparan sulfate and reduced S1/S2 cleavage. *J. Virol.* 2021; 95(21):e0135721.
5. Cascella M., Rajnik M., Aleem A., Dulebohn S.C., Napoli R.D. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19). (Cited 05 Jan 2022). [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776>.
6. Интернет: www.worldometers.info/coronavirus/#countries (по состоянию на 9 октября 2021 г.).
7. <https://www.kamgov.ru/emr/vulcangp/news/cto-nado-znat-odelta-stamme-covid-19-44759>. Европейское агентство: <https://www.pravda.com>.
8. Ян, В. Джеффри, С. Динамика пандемии COVID-19 в Индии и влияние дельта-варианта SARS-CoV-2 (В.1.617.2).- *МедРксив* 2021. Доступно в Интернете: www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.06.21.21259268v1.full-text (по состоянию на 9 октября 2021 г.). [Перекрестная ссылка].
9. Кодекс Республики Казахстан о здоровье народа и системе здравоохранения (с изменениями и дополнениями по состоянию) <https://online.zakon.kz/>.
10. Ирфан, У. Как дельта-вариант меняет ход пандемии. *Вокс Медиа*. 2021. Доступно в Интернете: www.vox.com/22547537/delta-coronavirus-variant-COVID-19-vaccines-masks-lockdown (по состоянию на 9 октября 2021 г.).
11. Ланг, К. Дельта-вариант имеет на 235% более высокий риск госпитализации в отделение интенсивной терапии, чем исходный вирус. *Medical News Today*, 8 октября 2021 г.
12. Калифорнийский университет в Дэвисе. Дельта-вариант: 8 вещей, которые вы должны знать. *Коронавирус; UC Davis Health: Сакраменто, Калифорния, США, 2021 г.*, Доступно в Интернете: <https://health.ucdavis.edu/coronavirus/COVID-19-information/delta-variant.html> (по состоянию на 9.10.2021 г.).
13. Теллез Д., Дайал С., Фан П., Моули А., Шах К., Консуджи Г., Теллез К., Руис К., Сабнис Р., Дайал С. и др. Анализ COVID-19 по диагностике, вакцине, лечению и патогенезу с клиническими сценариями. *Клин. Практика*. 2021, 11, 309-321. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed].
14. ВОЗ. Информационная панель ВОЗ по коронавирусу (COVID-19). 2021. Доступно в Интернете: <https://covid19.who.int/> (по состоянию на 8 октября 2021 г.).
15. <https://www.abc.net.au/news/2021-06-17/what-is-the-delta-variant-sydney-covid-outbreak>.
16. Ланг К. Дельта-вариант имеет на 235% более высокий риск госпитализации в отделение интенсивной терапии, чем исходный вирус. *Medical News Today*, 8 октября 2021 г.
17. Европейское агентство: <https://www.pravda.com>.
18. Теллез Д., Дайал С., Фан П., Моули А., Шах К., Консуджи Г., Теллез К., Руис К., Сабнис Р., Дайал С. и другие. Анализ COVID-19 по диагностике, вакцине, лечению и патогенезу с клиническими сценариями. *Клин. Практика* 2021, 11, 309-321. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed].
19. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-info.html#Concern>.
20. <https://indianexpress.com/article/explained/the-delta-variant-what-scientists-know-7371864>.
21. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.06.20.21259195v1.full-text>
22. Alpert, T. et al. Early introductions and transmission of SARS-CoV-2 variant B.1.1.7 in the United States. *Cell* 184, 2595–2604.e13 (2021).