

DOI: <https://doi.org/10.22263/2312-4156.2023.6.76>

Биологические и молекулярно-генетические особенности SARS-CoV-2

И.А. Субботина¹, В.М. Семенов², И.И. Куприянов¹

¹Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины, г. Витебск, Республика Беларусь

²Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, г. Витебск, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2023. – Том 22, №6. – С. 76-82.

Biological and molecular genetic features of SARS-CoV-2

I.A. Subotsina¹, V.M. Semenov², I.I. Kupriyanov¹

¹Vitebsk State Order of the Badge of Honor Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

²Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2023;22(6):76-82.

Резюме.

Целью проведенных исследований явилось изучение возможности циркуляции коронавируса SARS-CoV-2 в популяциях различных видов домашних и диких животных, изучение его биологических и молекулярно-генетических особенностей. Всего было задействовано 24 вида животных: кошка домашняя, собака, крупный рогатый скот, мелкий рогатый скот (овцы и козы), кролик (декоративный и промысловый), морская свинка, шиншилла, свинья домашняя, лошадь, осел, норка американская, лиса чернобурая, хорь темный, мангуст, носуха, олень благородный, мышь желтогорлая, полевка рыжая, крыса серая, попугай волнистый, птица (куры, лебедь-шипун), макак-резус. У 12 видов животных (50% от всех задействованных видов животных) получены положительные пробы по выделению РНК-вируса (при проведении ПЦР) и выделению специфических антител к вирусу SARS-CoV-2 (при проведении серологического исследования): кошка домашняя, собака, норка американская, хорь темный, носуха, коза камерунская, свинья, осел, лошадь, мышь желтогорлая, полевка рыжая, попугай волнистый. Наиболее часто вирус выделялся у кошки домашней (в 5,59% проб), норки американской (7,51% проб), собаки (10,52% проб). От норки американской и кошки домашней был выделен SARS-CoV-2, который культивировали на культуре клеток VERO, проведено его полногеномное секвенирование, что позволило выявить генетические особенности вируса и значимые участки мутаций. В ходе данного исследования была получена информация о 2 новых вирусах, относящихся по классификации Pango к подтипу B.1. При анализе выявленных мутаций было предположено, что изменения в геноме вируса произошли для облегчения проникновения вируса в клетки хозяина различных видов.

Таким образом было доказано, что SARS-CoV-2 способен инфицировать не только человека, но и различные виды животных, вызывая у отдельных видов животных развитие тяжелой инфекционной болезни и даже летальный исход. Проникновение вируса в организм различных видов животных возможно благодаря наличию в организме некоторых видов животных рецепторного белка ACE-2, а также благодаря изменениям в геноме самого вируса, которые были выявлены в наших исследованиях в вирусах, выделенных из организма кошки домашней и норки американской.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, COVID-19, домашние и дикие животные, секвенирование, мутации.

Abstract.

Objectives. To study the possibility of SARS-CoV-2 coronavirus circulation in the populations of various species of domestic and wild animals, to study its biological and molecular genetic characteristics. A total of 24 species of animals were involved: domestic cat, dog, cattle, small cattle (sheep and goats), rabbit (decorative and commercial), guinea pig, chinchilla, domestic pig, horse, donkey, American mink, silver fox, dark polecat, mongoose, nosuha, red deer, yellow-throated mouse, red vole, gray rat, budgie, bird (chickens, mute swan), rhesus macaque. Out of them, 12 animal species (50% of all animal species involved) had positive tests for the isolation of virus RNA (during PCR) and the isolation

of specific antibodies to SARS-CoV-2 (during the serological study): domestic cat, dog, American mink, dark polecat, nosuha, Cameroonian goat, pig, donkey, horse, yellow-throated mouse, red vole, budgie.

The virus was most often isolated from domestic cats (in 5.59% of samples), American mink (7.51% of samples), and dogs (10.52% of samples). SARS-CoV-2 was isolated from American mink and domestic cat using VERO cell culture, its full genome sequencing was carried out, which made it possible to identify the genetic characteristics of the virus and significant areas of mutations. During this study, information was obtained about 2 new viruses classified as subtype B.1 according to the Pango classification. When analyzing the identified mutations, it was assumed that changes in the genome of the virus occurred to facilitate the penetration of the virus into host cells of various species.

Thus, it was proved that SARS-CoV-2 is capable of infecting not only humans, but also various species of animals, causing the development of severe infectious disease and even death in certain animal species. The virus penetration into the body of various animal species is possible due to the presence of the ACE-2 receptor protein in the body of some animal species, as well as due to changes in the genome of the virus itself, that were identified in our studies in viruses isolated from the body of domestic cat and American mink.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, domestic and wild animals, sequencing, mutations.

Введение

Период конца 2019 – середины 2023 года запомнится человечеству, как одна из серьезных пандемий, вызванных коронавирусом, получившим имя SARS-CoV-2, и проявившихся болезнью, названной COVID-19, вспышки которой и сегодня продолжают регистрироваться по всему миру.

Учитывая сходство вируса SARS-CoV-2 с SARS-CoV, а также с родственными коронавирусами, циркулирующими у летучих мышей, считается, что вирус SARS-CoV-2 сформировался у отдельных видов рукокрылых в Китае. Однако в настоящее время все еще неясно, передался ли вирус непосредственно от летучей мыши человеку или через промежуточного хозяина, равно как и диким и домашним животным, которые могут выступать в качестве резервуаров вируса. В результате проведения ряда исследований было показано, что вирус SARS-CoV-2 способен реплицироваться в организме большого круга млекопитающих. Эта способность вируса связывается с ангиотензин-превращающим ферментом 2 (АПФ2), являющимся цинксодержащим металлоферментом. В настоящее время установлено, что АПФ2 обладает сродством к S-гликопротеинам ряда коронавирусов, включая вирусы SARS-CoV и SARS-CoV-2. Учитывая тот факт, что АПФ2 экспрессируется в большинстве тканей млекопитающих и является основой проникновения SARS-CoV-2 в клетку, можно предполагать возможный риск заражения данным вирусом широкого круга домашних животных, домашнего скота и диких животных [1-3].

Во время пандемии COVID-19 были зарегистрированы естественные случаи передачи вируса SARS-CoV-2 животным, в том числе свободно гуляющим белохвостым оленям (*Odocoileus virginianus*) в Северной Америке и выращиваемой американской норке (*Neovison vison*) на нескольких континентах [4-7]. Чтобы понять потенциал вирусного тропизма, опосредованного АПФ2, рядом ученых было изучено распределение рецепторов АПФ2 в тканях дыхательных путей и кишечника некоторых диких и полуодомашненных млекопитающих, включая парнокопытных (оленей, быков, верблюдов, свиней, бегемота), виды куньих и других млекопитающих с помощью иммуногистохимии. Экспрессия рецептора АПФ2 была обнаружена в бронхиальном или бронхиолярном эпителии нескольких европейских и азиатских видов оленей, двугорбого верблюда (*Camelus bactrianus*), европейского барсука (*Meles meles*), горноста (Mustela erminea), гиппопотама (*Hippopotamus amphibious*), морского тюленя (*Phoca vitulina*) и хохлача (*Cystophora cristata*). Дальнейшее картирование рецепторов АПФ2 в носовых раковинах и трахее выявило редкую экспрессию рецептора в эпителиальных клетках слизистой оболочки и случайное появление в подслизистом железистом эпителии козули западной (*Capreolus capreolus*), лося (*Alces alces*) и альпаки (*Vicunga pacos*). Только у европейского барсука и горноста наблюдались высокие уровни рецептора АПФ2 в эпителии слизистой оболочки носа, что может указывать на высокую восприимчивость к возбудителю новой респираторной инфекции. Экспрессия рецептора АПФ2 в клетках кишечника была повсеместной

во многих исследованных таксонах. Результаты исследований демонстрируют потенциальную возможность вирусной инфекции, опосредованной АПФ2, у некоторых диких млекопитающих и подчеркивают внутритаксоновую изменчивость экспрессии рецептора АПФ2, которая может влиять на восприимчивость хозяина и инфекцию [1, 2, 8-10].

Таким образом, актуальность вопроса о потенциальной возможности инфицирования различных видов животных и их роли в эпидемическом процессе не вызывает сомнения.

Цель работы – изучить интенсивность циркуляции вируса SARS-CoV-2 в популяциях домашних и диких животных и определить молекулярно-генетические особенности выделенных разновидностей вируса.

Материал и методы

Изучение циркуляции вируса SARS-CoV-2 проводилось в популяциях домашних и диких животных. Всего было задействовано 24 вида животных: кошка домашняя, собака, крупный рогатый скот, мелкий рогатый скот (овцы и козы), кролик (декоративный и промысловый), морская свинка, шиншилла, свинья домашняя, лошадь, осел, норка американская, лиса чернобурая, хорь темный, мангуст, носуха, олень благородный, мышь желтогорлая, полевка рыжая, крыса серая, попугай волнистый, птица (куры, лебедь-шипун), макак-резус.

Биологическим материалом для исследований служили: мазки или смывы со слизистых оболочек ротовой и носовой полостей (клюва у птиц), со слизистой оболочки прямой кишки (клоаки у птиц). У павших животных отбирали биоптаты паренхиматозных органов (легкие, сердце со сгустком крови, селезенка, печень, почки, лимфатические узлы (миндалины у птицы)).

ПЦР-исследование проводили с использованием отечественных наборов «АртБиоТех» (г. Минск, Республика Беларусь) и «СИВитал» (г. Витебск, Республика Беларусь). Серологическое исследование проводили с использованием набора «ID-VET» (Франция).

Культивирование вируса проводили на культуре клеток VERO в стандартных условиях.

Секвенирование образцов, выделенных от животных, было выполнено с последующей сборкой последовательности вируса SARS-CoV-2. Использована технология Nanopore MinION с по-

крытием 2600x. Результаты были депонированы в базе Gisaid [<https://gisaid.org/>].

Для обозначения и оценки клеточных линий вируса SARS-CoV-2 использовали номенклатурные системы Nextstrain и Pango, составленные в рамках базы данных GISAID. База данных GISAID является самым крупным в мире хранилищем последовательностей вирусов SARS-CoV-2 и содействует геномной эпидемиологии с целью мониторинга появления новых штаммов вируса SARS-CoV-2 по всей планете. Динамические номенклатурные системы Nextstrain и Pango были разработаны и опубликованы в начале 2020 года, и широко используются во всем мире как для классификации вирусов SARS-CoV-2, так и оценки географического распространения вариантов вируса, вызывающих озабоченность и научный интерес.

Результаты

В результате проведенного мониторинга по изучению циркуляции SARS-CoV-2 в популяциях различных видов животных нами были получены положительные результаты исследований (выделение РНК вируса SARS-CoV-2 либо выделение специфически антител к вирусу SARS-CoV-2) в популяциях следующих 12 видов животных (50% от всех обследованных видов): кошка домашняя (*Felis catus* Linnaeus, 1758), собака (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758), коза камерунская (*Capra hircus* Linnaeus, 1758), свинья домашняя (*Sus domesticus* Erxleben, 1777), лошадь (*Equus ferus* Boddaert, 1785), осел (*Equus asinus* Linnaeus, 1758), норка американская (*Neovison vison* Schreber, 1777), хорь темный (*Mustela putorius* Linnaeus, 1758), носуха (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766), попугай волнистый (*Melopsittacus undulatus* Shaw, 1805), желтогорлая мышь (*Sylvaemus flavicollis* Melchior, 1834), рыжая полёвка (*Myodes glareolus* Schreber, 1780).

Специфические антитела были выделены у кошки домашней в 34,9% проб сыворотки крови и у собаки в 6,7% проб, с титром антител от 0,705 до 3,361.

У двух видов животных – кошки домашней и норки американской – был выделен вирус и проведено его секвенирование.

В ходе данного исследования была получена информация о 2-х новых вариантах вируса SARS-CoV-2, относящихся по классификации Pango к подтипу B.1. Также были выявлены и отдельные

мутации в генетической структуре вируса. Списки значимых мутаций приведены в таблицах 1 и 2.

Генетически близкие последовательности приведены на рисунке 1.

Обсуждение

В настоящее время на основании многочисленных исследований, проведенных в разных странах, было установлено, что на ранних этапах пандемии COVID-19 (до февраля 2020 года) в геноме вируса стабильно фиксировались три основные группы мутаций, обусловившие три ветви эволюционного развития (кластер 1–3) вируса SARS-CoV-2. Основное число этих мутаций относится к гену ORF1ab, но только одна из них приводит к замене аминокислоты, а остальные единичные мутации являются синонимичными. Но уже к концу марта 2020 года эволюционное развитие трех кластеров замедлялось и в основном обнаруживались варианты вируса SARS-CoV-2 с G мутацией в S-гене (позиция D614G).

Нельзя исключить, что варианты вируса SARS-CoV-2 с данной мутацией появились уже в первой половине января 2020 года, а дальше произошло быстрое распространение 4 вариантов вируса SARS-CoV-2, имеющих данную мутацию. К апрелю 2020 года вирусы SARS-CoV-2, не содержащие в геномах мутацию D614G, встречались только в 25% случаев. Выявленная нами G-мутация в S-гене (позиция D614G) у вируса SARS-CoV-2, выделенного от животных, говорит об изменении биологических свойств вируса, облегчающих его передачу не только от человека к человеку, но и от человека к животным. Такая особенность может быть обусловлена тем, что мутация в позиции D614G затрагивает спайк-белок вируса SARS-CoV-2, который играет важную роль в проникновении вируса в клетки хозяина. Мутация в позиции D614G связана с повышенной инфекционностью и стала доминирующим вариантом во всем мире. Таким образом, отмеченное исследователями повсеместное распространение штаммов вируса SARS-CoV-2 у людей, имеющих мутацию в позиции D614G, обуславливающую

Таблица 1 – Список отличительных мутаций hCoV-19/mink/Belarus/RRPCEM-VIS_2216O/2021. Образец получен от *Mustela putorius furo* (2020-06-22) – Betacoronavirus Clade GH. GISAID Accession ID: EPI_ISL_2521999

Ген	Аминокислотные замены
S	D614G
S	R682Q
N	S194L
NS3	Q57H
NS7a	T61I
NS7a	V93F
NS7b	L6M
NSP2	A360V
NSP8	T141M
NSP12	P323L

Таблица 2 – Список отличительных мутаций hCoV-19/cat/Belarus/RRPCEM-VIS_1884O/2021. Образец получен от *Felis catus* (2020/11/19) – Betacoronavirus Clade GH. GISAID Accession ID: EPI_ISL_2100634

Ген	Аминокислотные замены
S	D614G
N	S194L
NS3	Q57H
NS7a	T61I
NS7a	V93F
NS7b	L6M
NSP8	T141M
NSP12	P323L

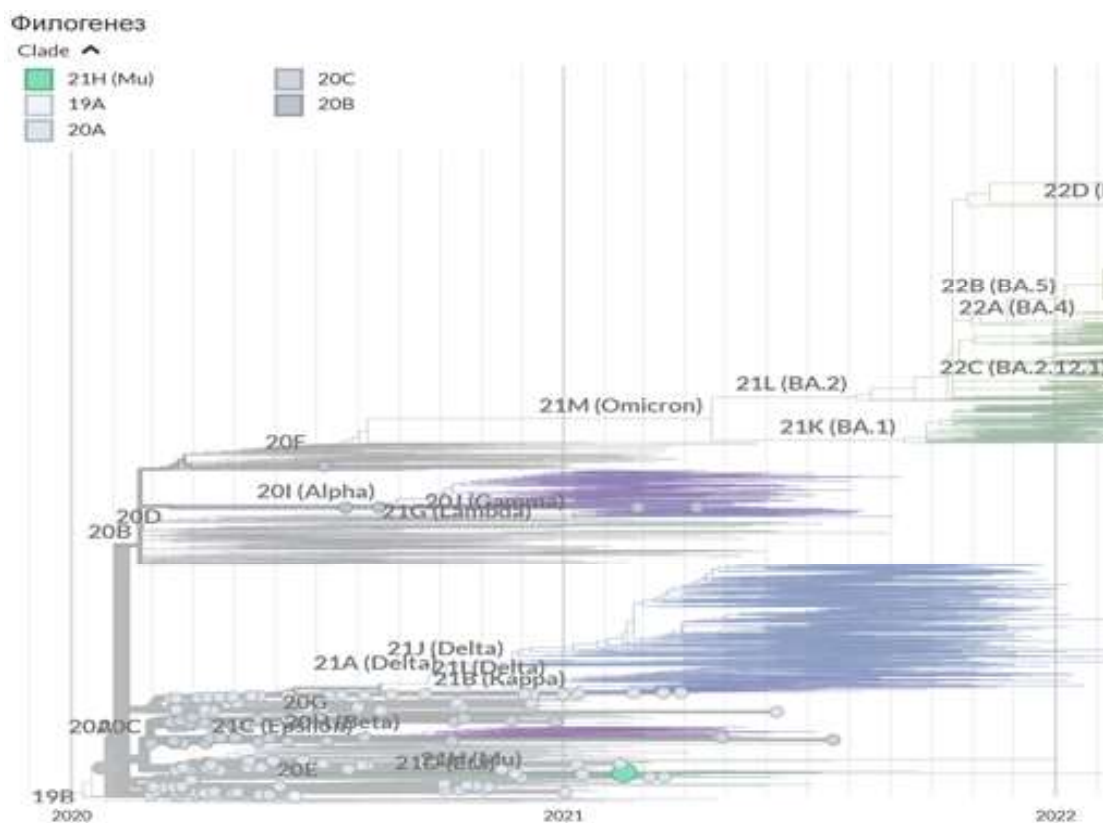


Рисунок 1 – Филогенетическое дерево пандемических штаммов вируса SARS-CoV-2. Точками обозначены 164 близких образца, относящихся к подтипу Pango B

ускоренный процесс контакта вируса с клеткой хозяина и проникновением в нее, и установленный нами факт циркуляции таких вирусов у животных позволяет предположить, что в дальнейшем могут происходить мутации, приводящие не только к еще более широкому распространению вируса SARS-CoV-2 у животных и птиц, но и изменяющие его вирулентность.

Полифункциональный структурный S-белок вируса SARS-CoV-2, необходимый для поддержания жизненного цикла вируса (life style), обеспечивает его адаптацию к различным условиям существования, определяет его контагиозность и патогенность. Спайковый белок SARS-CoV-2 имеет большое значение в патогенезе SARS-CoV-2. Помимо tMprSS spike SARS-CoV-2 может протеолитически активироваться другими клеточными протеазами, такими как катепсин B и 1 (эндосомальные цистеиновые протеазы), а также фурин, эластаза, фактор X и трипсин, которые способны к подобному «прайминговому» протеолизу, запускающему процесс вхождения вируса в клетки хозяина. Выявленная нами мутация R682Q распо-

ложена в рецептор-связывающем домене (RBD) спайк белка у штамма вируса SARS-CoV-2, выделенного от животных, может потенциально влиять на взаимодействие вируса с рецептором АПФ2, и тем самым на способность проникновения вируса внутрь клеток человека и животных.

Заключение

Таким образом проведенные исследования доказывают возможность циркуляции вируса SARS-CoV-2 в организме различных видов животных, вызывая у отдельных видов развитие инфекционной болезни и даже летальный исход. Проведенное полногеномное секвенирование вируса SARS-CoV-2, выделенного из организма кошки домашней и норки американской, показало значимые мутации в генетической структуре возбудителя, позволяющие ему легче проникать в клетки различных видов животных. Выделение вируса в большом количестве из организма домашних питомцев говорит о необходимости проведения более глубокого изучения данного

вопроса с точки зрения его эпидемической и возможной эпизоотической значимости.

Литература

1. Broad host range of SARS-CoV-2 predicted by comparative and structural analysis of ACE2 in vertebrates / J. Damas [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2020 Sep. Vol. 117, N 36. P. 22311–22322.
2. Susceptibility of Raccoon Dogs for Experimental SARS-CoV-2 Infection / C. M. Freuling [et al.] // Emerg. Infect. Dis. 2020 Dec. Vol. 26, N 12. P. 2982–2985.
3. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and different domestic animals to SARS-coronavirus-2 / J. Shi [et al.] // Science. 2020 May. Vol. 368, N 6494. P. 1016–1020.
4. Animals and COVID-19 [Electronic resource] / Centers for Disease Control and Prevention. Mode of access: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/daily-life-coping/animals.html>. Date of access: 27.12.2023.
5. Infection with SARS-CoV-2 in Animals : Aetiology Epidemiology Diagnosis Prevention and Control References [Electronic resource] / World Organisation For Animal Health. Mode of access: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/

COV-19/A_Factsheet_SARS-CoV-2.pdf. Date of access: 27.12.2023.

6. Guidance on working with farmed animals of species susceptible to infection with SARS-CoV-2 [Electronic resource] / World Organisation For Animal Health. Mode of access: https://www.woah.org/fileadmin/Home/MM/Draft_OIE_Guidance_farmed_animals_cleanMS05.11.pdf. Date of access: 27.12.2023.
7. SARA-CoV-2 infection in farmed minks, the Netherlands, April and May 2020 / N. Oreshkova [et al.] // Euro Surveill. 2020 Jun. Vol. 25, N 23. Art. 2001005.
8. Response & Containment Guidelines : Interim Guidance for Animal Health and Public Health Officials Managing Farmed Mink and other Farmed Mustelids with SARS-CoV-2 [Electronic resource]. Mode of access: https://www.aphis.usda.gov/publications/animal_health/sars-cov-2-mink-guidance.pdf. Date of access: 27.12.2023.
9. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2 / J. Shi [et al.] // Science. 2020 May. Vol. 368, N 6494. P. 1016–1020.
10. Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human / H. D. Song [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005 Feb. Vol. 102, N 7. P. 2430–2435.

Поступила 22.11.2023 г.

Принята в печать 20.12.2023 г.

References

1. Damas J, Hughes GM, Keough KC, Painter CA, Persky NS, Corbo M, et al. Broad host range of SARS-CoV-2 predicted by comparative and structural analysis of ACE2 in vertebrates. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 Sep;117(36):22311-22322. doi: 10.1073/pnas.2010146117
2. Freuling CM, Breithaupt A, Müller T, Sehl J, Balkema-Buschmann A, Rissmann M, et al. Susceptibility of Raccoon Dogs for Experimental SARS-CoV-2 Infection. Emerg Infect Dis. 2020 Dec;26(12):2982-5. doi: 10.3201/eid2612.203733
3. Shi J, Wen Z, Zhong G, Yang H, Wang C, Huang B, et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and different domestic animals to SARS-coronavirus-2. Science. 2020 May 29;368(6494):1016-20. doi: 10.1126/science.abb7015
4. Centers for Disease Control and Prevention. Animals and COVID-19. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/daily-life-coping/animals.html>. [Accessed 27th December 2023].
5. World Organisation For Animal Health. Infection with SARS-CoV-2 in Animals : Aetiology Epidemiology Diagnosis Prevention and Control References. Available from: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/COV-19/A_Factsheet_SARS-CoV-2.pdf. [Accessed 27th December 2023].

6. World Organisation For Animal Health. Guidance on working with farmed animals of species susceptible to infection with SARS-CoV-2. Available from: https://www.woah.org/fileadmin/Home/MM/Draft_OIE_Guidance_farmed_animals_cleanMS05.11.pdf. [Accessed 27th December 2023].
7. Oreshkova N, Molenaar RJ, Vreman S, Harders F, Munnink BBO, Hakze-van der Honing RW, et al. SARA-CoV-2 infection in farmed minks, the Netherlands, April and May 2020. Euro Surveill. 2020 Jun;25(23):2001005. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.23.2001005
8. Response & Containment Guidelines: Interim Guidance for Animal Health and Public Health Officials Managing Farmed Mink and other Farmed Mustelids with SARS-CoV-2. Available from: https://www.aphis.usda.gov/publications/animal_health/sars-cov-2-mink-guidance.pdf. [Accessed 27th December 2023].
9. Shi J, Wen Z, Zhong G, Yang H, Wang C, Huang B, et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. Science. 2020 May;368(6494):1016-20. doi: 10.1126/science.abb7015
10. Song HD, Tu CC, Zhang GW, Wang SY, Zheng K, Lei LC, et al. Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Feb;102(7):2430-5. doi: 10.1073/pnas.0409608102

Submitted 22.11.2023

Accepted 20.12.2023

Сведения об авторах:

И.А. Субботина – к.в.н, доцент кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней, Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины; докторант кафедры инфекционных болезней с курсом ФПК и ПК, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет; <https://orcid.org/0000-0001-8346-2988>,

e-mail: irin150680@mail.ru – Субботина Ирина Анатольевна;

В.М. Семенов – д.м.н., профессор, зав. кафедрой инфекционных болезней с курсом ФПК и ПК, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, <https://orcid.org/0000-0002-7029-9226>;

И.И. Куприянов – ассистент кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней, Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины, <https://orcid.org/0000-0001-7436-3099>.

Information about authors:

I.A. Subotsina – Candidate of Veterinary Sciences, associate professor of the Chair of Epizootology and Infectious Diseases, Vitebsk State Order of the Badge of Honor Academy of Veterinary Medicine; doctoral student of the Chair of Infectious Diseases with the course of the Faculty for Advanced Training & Retraining, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, <https://orcid.org/0000-0001-8346-2988>,

e-mail: irin150680@mail.ru – Irina A. Subotsina;

V.M. Semenov – Doctor of Medical Sciences, professor, head of the Chair of Infectious Diseases with the course of the Faculty for Advanced Training & Retraining, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, <https://orcid.org/0000-0002-7029-9226>;

I.I. Kupriyanov – lecturer of the Chair of Epizootology and Infectious Diseases, Vitebsk State Order of the Badge of Honor Academy of Veterinary Medicine, <https://orcid.org/0000-0001-7436-3099>.