

ВЫДЕЛЕНИЕ SARS-COV-2 ИЗ ОРГАНИЗМА ЖИВОТНЫХ И ЕГО МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

И. А. СУББОТИНА, И. И. КУПРИЯНОВ

*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь, 210026, e-mail: irin150680@mail.ru
ORCID ID 0000-0001-8346-2988, ORCID ID 0000-0001-7436-3099*

В. М. СЕМЕНОВ

*УО «Витебский государственный ордена «Дружбы Народов» медицинский университет»,
г. Витебск, Республика Беларусь, 210026*

(Поступила в редакцию 10.04.2025)

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 34 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 черно-бурая, лиса рыжая, енотовидная собака, хорь темный, мангуст, носуха, лось европейский, лань европейская, олень пятнистый, олень благородный, косуля, кабан европейский, мышь желтогорлая, полевка рыжая, крыса серая, мышь домашняя, птица (куры, лебедь-шипун, сова ушастая, пугай волнистый, чирок-трескунок), макака-резус. У 13 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, чирок-трескунок. 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, животные-компаньоны, секвенирование, мутации.

The aim of the research was to study the possibility of SARS-CoV-2 coronavirus circulation in populations of various species of domestic and wild animals, to study its biological and molecular genetic features. A total of 34 animal species 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, red fox, raccoon dog, dark polecat, mongoose, coati, European elk, European fallow deer, sika deer, red deer, roe deer, European wild boar, yellow-necked mouse, red vole, gray rat, house mouse, birds (chickens, mute swan, long-eared owl, budgerigar, garganey), rhesus macaque. Positive samples for the isolation of RNA virus (using PCR) and the isolation of specific antibodies to the SARS CoV-2 virus (using serological testing) were obtained from 13 animal species: domestic cat, dog, American mink, dark ferret, coati, Cameroon goat, pig, donkey, horse, yellow-necked mouse, red vole, budgerigar, and garganey. The virus was most often isolated from domestic cats (5.59 % of samples), American minks (7.51 % of samples), and dogs (10.52 % of samples). SARS-CoV-2 was isolated from American minks and domestic cats, cultured in VERO cell culture, and whole-genome sequencing was performed, which made it possible to identify the genetic features of the virus and significant mutation sites. In the course of this study, information was obtained on 2 new viruses classified as subtype B.1 by Pango. When analyzing the identified mutations, it was suggested that changes in the virus genome occurred to facilitate the penetration of the virus into host cells of various species. Thus, it was proven that SARS-CoV-2 is capable of infecting not only humans, but also various animal species, causing severe infectious diseases and even death in certain animal species. Penetration of the virus 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, which were identified in our studies in viruses isolated from the body of a domestic cat and an American mink.

Key words: SARS-CoV-2, COVID-19, domestic and wild animals, companion animals, sequencing, mutations.

Введение

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 непосред-

ственно 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, 2, 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 не скольких континентах [4, 5, 6, 7]. Чтобы понять потенциал вирусного тропизма, опосредованного АПФ2, рядом ученых было изучено распределение рецепторов АПФ2 в тканях дыхательных путей и кишечника некоторых диких и полудомашних млекопитающих, включая парнокопытных (олений, 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*), горностая (*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 ко сули западной (*Capreolus capreolus*), лося (*Alces alces*) и альпаки (*Vicugna pacos*). Только у европейского барсука и горностая 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, 9, 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.

Основная часть

Изучение циркуляции вируса SARS-CoV-2 проводилось в популяциях домашних и диких животных. Всего было задействовано 34 вида животных: кошка домашняя, собака, крупный рогатый скот, мелкий рогатый скот (овцы и козы), кролик, морская свинка, шиншилла, свинья домашняя, лошадь, осел, норка американская, лиса черно-бурая, лиса рыжая, хорь темный, мангуст, носуха, енотовидная собака, лань европейская, косуля, лось европейский, олень благородный, олень пятнистый, кабан европейский, крыса серая, мышь желтогорлая, полевка рыжая, мышь домашняя, попугай волнистый, домашняя птица (куры), лебедь-шипун, чирок-трескунок, сова ушастая, макака резус.

В качестве биологического материала для проведения молекулярно-генетических исследований отбирали: смывы со слизистых оболочек (глотка, носовая полость, конъюнктивы, прямая кишка), истечения из носа и глаз, фекалии, кровь стабилизированную, кусочки паренхиматозных органов (селезенка, лимфатические узлы, легкое, сердце со сгустком, почки, печень).

Выявление вирусной РНК проводили с помощью ПЦР, с использованием наборов АртБиоТех (г. Минск).

Выделение вируса проводили на культуре клеток VERO.

Секвенирование образцов коронавируса, выделенных от животных, было выполнено с последующей сборкой последовательности вируса SARS-CoV-2. Использована технология Nanopore MinION с покрытием 2600x. Результаты были депонированы в базе GISAID [<https://gisaid.org/>].

Динамическая номенклатурная система Pango была разработана и опубликована в начале 2020 г. и с тех пор широко используется во всем мире для классификации SARS-CoV-2. Каждая линия Pango направлена на определение эпидемиологически значимого филогенетического кластера.

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 SARS-CoV-2) в популяциях следующих 13 видов животных: 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 (*Neovision 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), чирок-трескунок (*Anas querquedula*).

У двух видов животных – кошки домашней и норки американской дополнительно был выделен вирус на культуре клеток VERO и проведено его секвенирование.

В ходе данного исследования была получена информация о 2 новых вирусах, относящихся по классификации Pango к подтипу В.1. Также были выявлены и отдельные мутации в генетической структуре вируса. Списки значимых мутаций приведены в табл. 1 и 2.

Таблица 1. Список отличительных мутаций hCoV-19/mink/Belarus/RRPCEM-VIS_22160/2021. 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_18840/2021. 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

Генетически близкие последовательности приведены на рис. 1.

Согласно данным мониторинга циркулирующих штаммов, подтип В.1 представляет большую Европейскую линию, которая вызвала вспышку заболеваемости в северной Италии в начале 2020 года. Стоит отметить некоторые мутации, найденные в последовательностях – D614G, например, затрагивает спайк белок вируса, который играет важную роль в проникновении вируса в клетки хозяина. Мутация D614G связана с повышенной инфекционностью и стала доминирующим вариантом во всем мире.

Филогенез

Clade ^

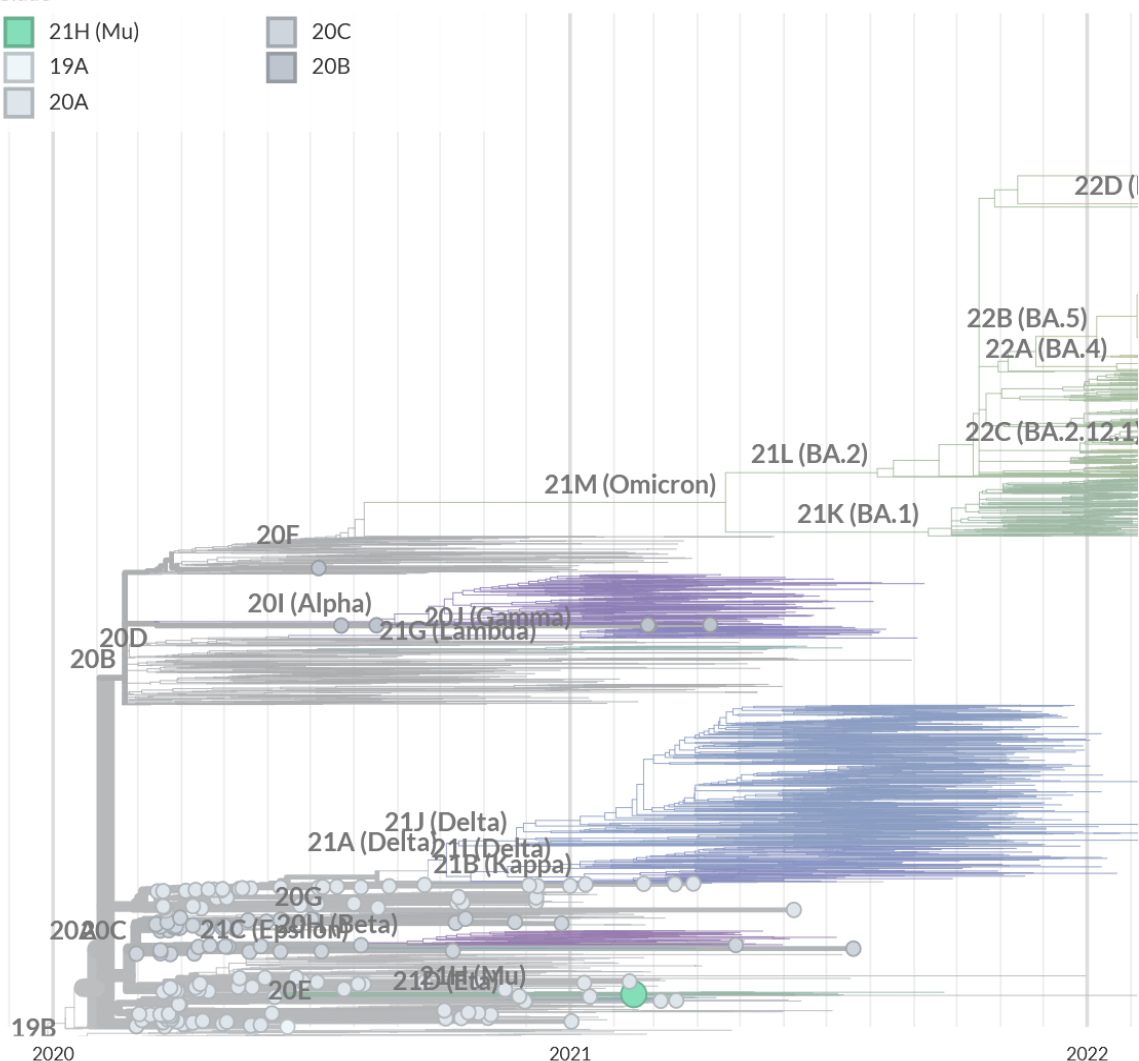


Рис. 1. Филогенетическое дерево пандемических штаммов SARS-CoV-2.
Точками обозначены 164 близких образца, относящихся к подтипу Pango B.1.

Мутация R682Q расположена в рецептор-связывающем домене (RBD) спайк белка. Она может потенциально влиять на взаимодействие вируса с рецептором ACE2, также влияя на способность проникновения вируса внутрь клеток человека и животных.

Заключение

Таким образом, проведенные исследования доказали не только возможность циркуляции SARS-CoV-2 в организме различных видов животных, но и позволили доказать, что циркуляция данного возбудителя в организме отдельных видов животных может вызывать развитие тяжелой 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 клетку 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 эпидемиологической 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. SARS-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.