

DOI:10.34617/nqc2-1135  
УДК 574.24

## КОРОНАВИРУСЫ И ЖИВОТНОВОДСТВО

**Зимин Андрей Антонович**<sup>1</sup>, канд. биол. наук

**Осепчук Денис Васильевич**<sup>2,3</sup>, д-р с-х. наук

<sup>1</sup>*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», г. Пушкино, Российская Федерация*

<sup>2</sup>*ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии», г. Краснодар, Российская Федерация*

<sup>3</sup>*ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина», г. Краснодар, Российская Федерация*

Коронавирусы вызывают ряд инфекций не только у человека, но и у сельскохозяйственных животных. Одним из наиболее охарактеризованных коронавирусов сельскохозяйственных животных является бычий коронавирус – BCoV. Филогения данного вируса в широком контексте отряда Nodovirinae, к которому относится ряд родственных семейств, включая и семейства Coronaviridae. Для характеристики родственного окружения семейства Coronaviridae и бычьего коронавируса было предпринято филогенетическое исследование аминокислотных последовательностей ключевого фермента этих вирусов РНК-зависимой РНК-полимеразы методом UPGMA.

**Ключевые слова:** BCoV; бычий коронавирус; бетакоронавирус; SARS-COV-2; COVID-19; SARS-COV; MERS-COV; коронавирус; коронавирусы; метод UPGMA

## CORONAVIRUSES AND LIVESTOCK

**Zimin Andrei Antonovich**<sup>1</sup>, PhD Biol. Sci.

**Osepchuk Denis Vasilyevich**<sup>2,3</sup>, Dr. Agr. Sci.

<sup>1</sup>*Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms named after G. K. Scriabin RAS – a separate subdivision of the Federal Research Center «Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences», Pushchino, Russian Federation*

<sup>2</sup>*Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Krasnodar, Russian Federation*

<sup>3</sup>*Kuban State Agrarian University named after I. T. Trubilin, Krasnodar, Russian Federation*

Coronaviruses cause a number of infections not only in humans, but also in farm animals. One of the most characterized coronaviruses in farm animals is the bovine coronavirus BCoV. The phylogeny of this virus in the broad context of the order Nodovirinae, which includes a number of related families including the Coronaviridae family. To characterize the related environment of the Coronaviridae family and the bovine coronavirus, a phylogenetic study of the amino acid sequences of the key enzyme of these viruses of RNA-dependent RNA polymerase by UPGMA method was undertaken.

**Key words:** BCoV; bovine coronavirus; SARS-COV-2; COVID-19; SARS-COV; MERS-COV; coronavirus; betacoronavirus; coronaviruses; terrestrial animal microbiota; UPGMA method

В то время как многие люди впервые слышат о коронавирусе, поскольку штамм COVID-19 заражает людей [1], коронавирусы не являются чем-то новым для животноводов, производителей скота и птицы. Центры по контролю и профилактике

заболеваний отмечают, что коронавирусы человека обычно вызывают легкие или умеренные заболевания верхних дыхательных путей, такие как обычная простуда. Большинство людей заражаются одним или несколькими из этих вирусов в определенный момент своей жизни. Коронавирусы одновременно являются очень распространенными вирусами при разведении сельскохозяйственных животных и птицеводстве. Они регулярно наблюдаются во всем мире [2]. Появление очередного тяжелого острого респираторного синдрома (COVID-19) показывает, что коронавирусы могут постепенно появляться из возможных источников животного происхождения и могут вызывать потенциально смертельные заболевания у людей. Следовательно, надо уделять большое внимание появлению новых штаммов коронавирусов и сравнительному патогенезу SARS CoV2 с теми коронавирусами, которые вызывают кишечные и респираторные инфекции у различных животных-хозяев, в том числе сельскохозяйственных животных [2].

**Коронавирусы сельскохозяйственных животных.** Эпидемическая диарея свиней CoV (PEDV) впервые появилась из неизвестного источника в Европе и Азии в 1970-х и 1980-х годах, вызывая тяжелую диарею и повсеместную смертность среди поросят, прежде чем стать эндемичной у свиней. PEDV отсутствует у американских свиней. Интересно, что PEDV генетически более тесно связан с CoV 229E человека, чем с другим CoV группы I животных, и в отличие от CoV другой группы I, он растет в клетках Vero, также как SARS CoV. Эти наблюдения поднимают интригующие вопросы о его происхождении [3].

Альтернативно новые штаммы CoV, отличающиеся по тканевой специфичности и вирулентности, могут возникать из существующих штаммов. Менее вирулентный респираторный коронавирус свиньи (PRCV) эволюционировал как мутант с делецией гена S в высоко вирулентный штамм кишечного, трансмиссивного коро-

навируса гастроэнтерита (TGEV). Любопытно, что различия в размерах области делеции с 5'-конца S-гена (621–681 нуклеотидов) между европейскими и американскими штаммами PRCV свидетельствуют об их независимом происхождении на двух континентах в течение одного периода времени (1980-е годы). Удаление этой области (или в сочетании с делециями в ORF 3a), по-видимому, объясняет измененный тропизм к тканям от кишечной к легочной и снижение вирулентности штаммов PRCV [3].

Способность некоторых коронавирусов сохраняться в своем хозяине также предоставляет большую возможность для отбора новых мутантов с измененным тканевым тропизмом и вирулентностью из числа квазидисперсных вирусных РНК. Примером является вирулентный системный штамм вирусного инфекционного перитонита кошек (FIPV), который, вероятно, возникает в результате персистирующей у кошек инфекции менее вирулентным кишечным штаммом кошачьего коронавируса [2].

Кроме того, коронавирусы животных могут приобретать новые гены посредством рекомбинации коронавирусной геномной РНК. Примером этого является приобретение С-подобного гемагглютинина гриппа бычьим коронавирусом или его предком. Рекомбинационные события среди коронавирусов могут также генерировать новые штаммы с измененной тканевой специфичностью или тропизмом к животному хозяину коронавируса. Например, рекомбинация между S-белками коронавирусов кошек и мышей позволяет CoV кошек заражать мышей. Недавний филогенетический анализ позволяет предположить, что SARS CoV2, возможно, также возник в результате прошлой рекомбинации родительских штаммов с разным тропизмом к животному-хозяину по гену S, представляющим мозаику прошлых рекомбинаций. Это признание того, что CoVs могут далее эволюционировать в популяции хозяина

и что подобные события могут происходить, если SARS CoV2 сохранится у людей [2].

**Бычий коронавирус.** BCoV вызывает три различных клинических синдрома у крупного рогатого скота: диарею телят; зимнюю дизентерию с геморрагической диареей у взрослых коров; и респираторные инфекции у крупного рогатого скота разных возрастов, включая судорожную лихорадку [4]. Основываясь на серопревалентности антител против BCoV, вирус повсеместно распространен среди крупного рогатого скота. Все изоляты BCoV как от кишечных, так и от респираторных инфекций являются антигенно сходными в тестах на нейтрализацию вируса, включая один серотип, но с двумя-тремя подтипами, идентифицированными с помощью нейтрализации вируса или с использованием моноклональных антител. Кроме того, генетические различия (точечные мутации, но не делеции) были обнаружены в гене S при сравнении кишечных и респираторных изолятов, в том числе от одного и того же животного. При этом субклиническое выделение носовых и фекальных вирусов, обнаруженное у телят, зараженных гетерологичными штаммами BCoV, подтвердило предположения, показывающие, что субклинически инфицированные животные могут быть резервуаром для BCoV [4].

Бычий коронавирус, наряду с SARS-CoV, SARS-CoV-2, and Bat SL-CoV-WIV1, HCoV-OC43 and HCoV-NKU1 Middle East respiratory syndrome-related coronavirus, Pipistrellus bat coronavirus HKU5 относят к роду Betacoronavirus, подсемейства Orthocoronavirinae, семейства Coronaviridae, отряда Nidovirales, царства Riboviria (вирусы с геномами из РНК или РНК-содержащие вирусы) [6]. Есть и ряд других подходов к таксономии этих вирусов на основе широких исследований их геномов последних лет. Хотя ещё недавно BCoV (бычий коронавирус) относили к первой подгруппе рода Betacoronavirus, сейчас его наряду с SARS-CoV, SARS-CoV-

2, and Bat SL-CoV-WIV1 относят ко второй подгруппе этого рода. Геномные данные о близости бычьего коронавируса к коронавирусам, вызывающим сильный легочный синдром, накоплены в последние годы [4].

Сравнительно недавние исследования показали, что бычий коронавирус – BCoV – имеет сходную геномную организацию с бета-коронавирусами, состоящую из 5'-нетранслируемой области (UTR), репликационного комплекса (orf1ab), кодирующего неструктурные белки (nsps), белок шипика (S) ген, белок оболочки вируса (E), ген мембранного белка (M), ген нуклеокапсидного белка (N), 3'-UTR и несколько неидентифицированных открытых рамок считывания [5]. Хотя BCoV многие исследователи относят к группе бета-коронавирусов, он отличается от SARS-CoV-2 MERS-CoV, и SARS-CoV. Показано, что геном BCoV имеет идентичность нуклеотидов <70 % и сходство нуклеотидов <80 % с геномом этих вирусов [2]. Мы поставили задачу рассмотреть дальнейшие родственные связи этого вируса.

**Методика исследований.** Для поиска гомологов белка RdRp BCoV использовалась часть аминокислотной последовательности orf1ab, кодирующая РНК-зависимую репликативную РНК-полимеразу этого вируса. Для сравнения аминокислотных последовательностей с базами данных NCBI GenBank использовались алгоритмы BLASTp и PSI-BLAST [7]. Хиты, найденные с использованием алгоритма PSI-BLAST с  $E < e^{-10^{78}}$  были взяты для дальнейшего изучения. Все аминокислотные последовательности гомологов RdRp BCoV в формате FASTA использовали для обработки в пакете программ MEGA6 [9]. Выравнивание осуществляли при помощи алгоритма MUSCLE [8]. Эволюционный анализ также был проведен в MEGA6 [9]. Эволюционная история была выведена с использованием метода UPGMA [9]. Консенсусное дерево было выведено путем 1000 повторов теста взяты для представления эволюционной исто-

рии таксонов. Ветви, соответствующие разветвлениям, были воспроизведены только те, которые имелись не менее чем в 50 % повторах теста начальной загрузки. Эволюционные расстояния были вычислены с использованием матричного метода JTT [9] и в единицах числа аминокислотных замен на сайт. В анализе были использованы 46 аминокислотных последовательностей. Все позиции, содержащие пробелы и пропущенные данные, были исключены. Эволюционные анализы были проведены в пакете программ MEGA6 [9].

**Результаты исследований и их обсуждение.** Систематическое положение семейства коронавирусов хорошо отражает наше небольшое исследование филогении РНК-зависимой РНК-полимеразы отряда Nidovirales, к которому принадлежит исследуемое нами семейство. Отряд (порядок) Nidovirales состоит из ряда семейств. Это Abyssoviridae, Arteriviridae, Coronaviridae, Medioniviridae, Mesoniviridae, Mononiviridae, Euroniviridae, Roniviridae, Tobaniviridae.

Для установления эволюционных связей внутри данного отряда мы провели филогенетический анализ ключевого фермента репликации вирусных геномов (RdRp). Для анализа мы взяли наиболее характерных представителей из каждого семейства. Это были представители из семейства Tobaniviridae: вирус краснополосной змеи из Гуандуна, торовирус водяной змей из Гуандуна, вирус ядовитой рептилии *Tiliqua rugosa*, вирус гуандунской змеи, поедателя мандариновых крыс, а также нидовирус секреторных клеток планарий. Из семейства Mesoniviridae были взяты следующие представители: Вирус Хана, Вирус Дианке, Альфамезивирус 1, Вирус Мено, Вирус Казуарина, Вирус Нам Динь. Из семейства Coronaviridae были взяты: коронавирус ОРВИ летучей мыши, коронавирус летучей мыши BtRf-BetaCoV / JL2012, коронавирус острого респираторного синдрома MA15 ExoN1, ко-

роневирус циветты ShanghaiQXC2, коронавирус циветты Civet, SARS CoV 007/2004 и SARS CoV2. Род бетакоронавирусов был представлен бычьим коронавирусом, коронавирусом человека OC43. Из рода Alphacoronavirus были взяты *Mystacina* коронавирус из Новой Зеландии, крысиный вирус из Люченга, альфа-коронавирус летучей мыши, коронавирус летучей мыши Скалистых гор а также коронавирус эпидемической диареи свиней.

Дерево образовало ветви, полностью соответствующие классической систематике отряда Nidovirales. В первой ветви также наблюдается разбиение на несколько подветвей, соответствующих разделению этого семейства на роды. Единственным исключением был коронавирус крысы из Люченга. Его РНК-зависимая РНК-полимераза проявила большее сходство с ферментами бетакоронавирусов, хотя данный коронавирус относится к роду альфакоронавирусов. В первую ветвь вошли все найденные белки, сходные с ферментом BCoV. Вторая подветвь, достаточно близка к первой. Она состоит из ферментов вирусов семейства Tobaniviridae. Они, видимо, наиболее близки к коронавирусам семейства Coronaviridae. Третью, пожалуй, самую однородную и интересную подветвь образовали гомологи из семейства Arteriviridae. Немного более удаленными семействами являются Mesoniviridae и Roniviridae. Семейство Mononiviridae по результатам проведенного анализа образует отдельную ветвь внутри отряда Nidovirales. Исследование вирусов сельскохозяйственных животных необходимо с точки зрения практики животноводства, разведения животных и ветеринарии. Дополнительным аспектом таких исследований является вопрос возможных зоонозов. Зоонозы могут быть связаны и со сменой животного – хозяина и с расширением круга хозяев. Для представителей семейства Coronaviridae известны уже несколько случаев такого явления.

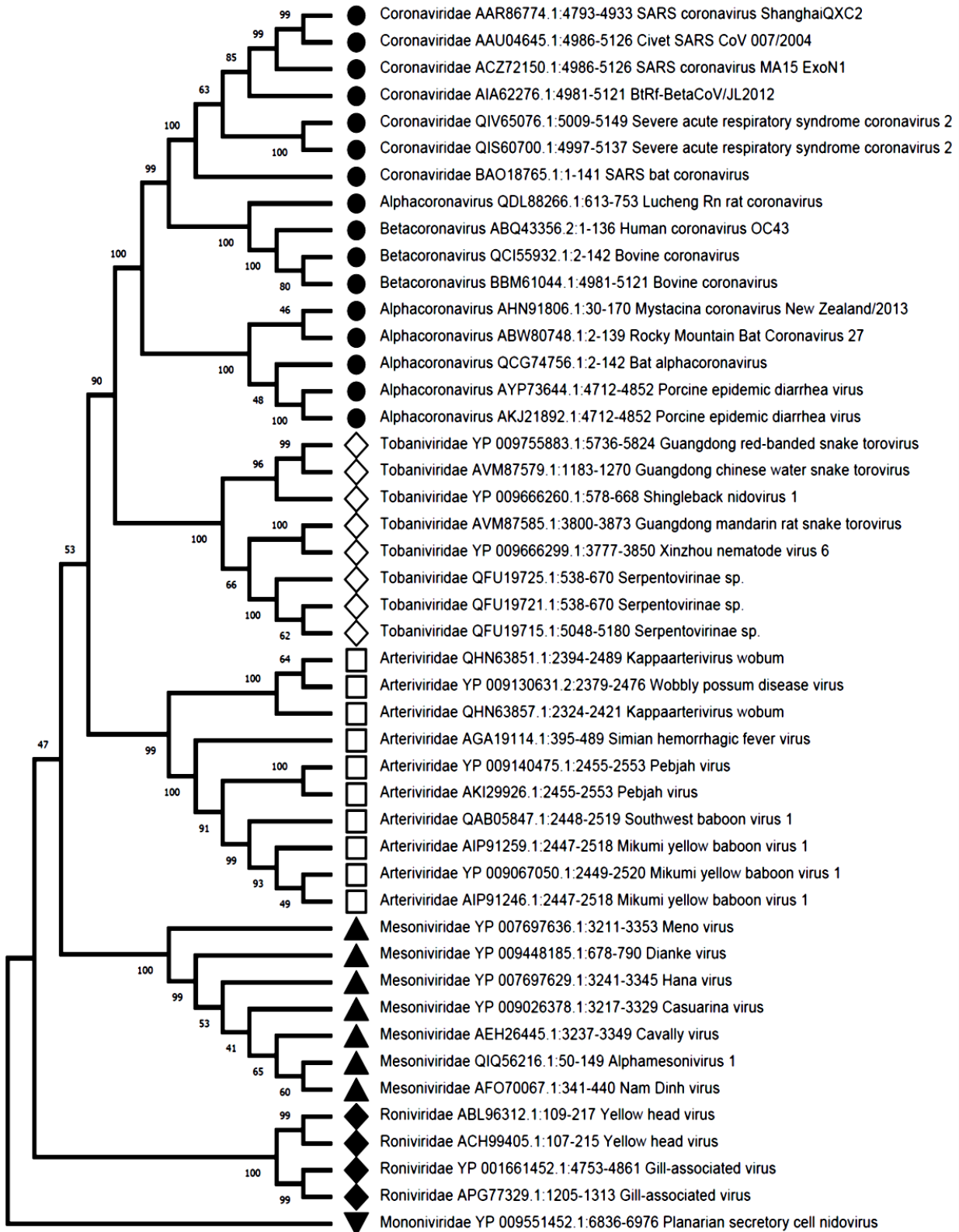


Рисунок 1 – Филогенетическое дерево эволюционного сходства РНК-зависимых РНК-полимераз бычьего коронавируса и ферментов вирусов родственных семейств Coronaviridae, Arteriviridae, Medioniviridae, Mesoniviridae, Mononiviridae, Euroniviridae, Roniviridae отряда Нидовирусов

Современная пандемия COVID-19 как раз и является подобным случаем. В этой ситуации внимание должно быть уделено не только вирусам семейства Coronaviridae, для которых известны случаи расширения круга хозяев, ведущего к появлению возбудителей опасных инфекций у людей, но и наиболее близким родственникам коронавирусов. Для представителей таких семейств можно ожидать явлений сходных с расширением и сменой круга хозяев, характерных для представителей семейства Coronaviridae. На основе проведенного филогенетического анализа репликативной РНК-зависимой РНК-полимеразы вирусов животных и человека отряда Nidovirales следует обратить особое внимание на представителей семейств Tobaniviridae и Arteriviridae, как претендентов на формирование возбудителей возможных зоонозов из-за их генетической близости к коронавирусам семейства Coronaviridae.

**Заключение.** Возможность трансмиссии вирусов животных на человека учтена в рекомендации ВОЗ [1]. «Любой, кто посещает рынки живых животных или рынки продуктов животного происхождения, должен соблюдать общие гигиенические меры, включая регулярное мытье рук с мылом и водой после прикосновения к животным и продуктам животного происхождения, избегая касания глаз, носа или рта руками и избегая контакта с больными животными или испорченными продуктами животного происхождения. Следует избегать любого контакта с другими животными, возможно живущими на рынке (например, бездомными кошками и собаками, грызунами, птицами, летучими мышами)».

**Выводы.** 1. Для установления эволюционных связей внутри отряда Nidovirales РНК-вирусов мы провели филогенетический анализ ключевого фермента репликации вирусных геномов РНК-зависимой РНК-полимеразы методом UPGMA. Для анализа мы взяли наиболее

характерных представителей из каждого семейства внутри этого отряда

2. Семействами наиболее близкими к Coronaviridae по данным данного филогенетического анализа репликативной вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы являются РНК-полимеразы вирусов семейств Tobaniviridae, Arteriviridae. Более удаленными семействами являются Mesoniviridae и Roniviridae.

3. Семейство Mononiviridae по результатам проведенного анализа образует отдельную ветвь внутри отряда Nidovirales.

4. При исследовании вирусов животных отряда Nidovirales следует обратить особое внимание на представителей семейств Tobaniviridae и Arteriviridae, как претендентов на формирование возбудителей возможных зоонозов из-за их генетической близости к коронавирусам семейства Coronaviridae.

### Список литературы

1. Доклад ВОЗ. WHO Coronavirus disease (COVID-2019) R&D (<https://www.who.int/blueprint/priority-diseases/key-action/novel-coronavirus/en> Дата обращения 22 апреля 2020 года).
2. Bolles M. SARS-CoV and emergent coronaviruses: viral determinants of interspecies transmission / M. Bolles, E. Donaldson, R. Baric // Curr. Opin. Virol. 2011;1:624-634.
3. Jung K. Porcine deltacoronavirus infection: etiology, cell culture for virus isolation and propagation, molecular epidemiology and pathogenesis / K. Jung, H. Hu, L.J. Saif // Virus Res. 2016;226:50-59.
4. Ellis J. What is the evidence that bovine coronavirus is a biologically significant respiratory pathogen in cattle? / J. Ellis // Can Vet J. 2019 Feb;60(2):147-152.
5. Vlasova A.N. Molecular characterization of a new species in the genus Alphacoronavirus associated with mink epizootic catarrhal gastroenteritis / A.N. Vlasova, R. Halpin, S. Wang, E. Ghedin, D.J. Spiro, L.J. Saif // J. Gen. Virol. 2011;92:1369-1379.

6. International Committee on Taxonomy of Viruses and King A.M.Q. Academic Press; 2012. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.

7. Altschul S.F. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs / S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J.

Lipman // Nucleic Acids Res. 1997 - Sep 1;25(17):3389-402.

8. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res. 2004 Mar 19;32(5):1792-7.

9. Tamura K. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 / K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipinski, S. Kumar // Mol. Biol. Evol. 2013 - V. 30. P. 2725-2729.

DOI

УДК 574.24

### **ПОИСК ГОМОЛОГОВ S2-БЕЛКА ШИПИКОВ БЫЧЬЕГО КОРОНАВИРУСА В МЕТАГЕНОМАХ ОКЕАНА И СИЛОСА, И АНАЛИЗ ИХ ФИЛОГЕНИИ МЕТОДОМ UPGMA**

**Зимин Андрей Антонович**<sup>1</sup>, канд. биол. наук

**Карманова Александра Николаевна**<sup>1,2</sup>

**Осепчук Денис Васильевич**<sup>3,4</sup>, д-р с.-х. наук<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение ФИЦ

«Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,

г. Пущино, Российская Федерация

<sup>2</sup>Вятский государственный Российская университет, г. Киров

<sup>3</sup>ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии»,

г. Краснодар, Российская Федерация

<sup>4</sup>ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина», г. Краснодар, Российская Федерация

В данной работе проведен поиск океанических гомологов белка S2 шипиков бычьего коронавируса. В метагеномах планктонической и осадочной микробиот мирового океана было найдено 15 и 4 гомологов этого вирусного белка соответственно. Выбор S2-гликопротеина в качестве объекта исследования базировался на нескольких факторах – схожести его структуры у коронавирусов разных родов и высокой консервативности их последовательностей. Анализ океанических гомологов поможет лучше понять пути происхождения исследуемого белка. Филогения данного набора аминокислотных последовательностей была исследована методом UPGMA.

**Ключевые слова:** BCoV; бычий коронавирус; SARS-COV-2; COVID-19; SARS-COV; MERS-COV; коронавирус; бетакоронавирус; коронавирусы; микробиота пелагики океана; микробиота наземных животных; метагеномика; метод UPGMA