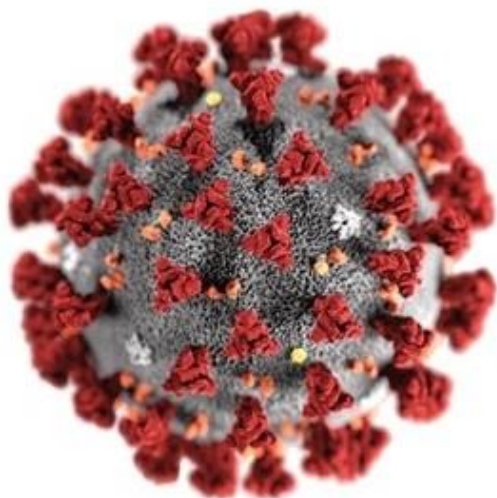


Информация

за първичния произход на вируса SARS - CoV-2 (нов коронавирус),
причинител на епидемията от остър респираторен синдром



SARS-CoV-2

According to WHO

Според СЗО
Заболяването, причинено от новия
коронавирус SARS-CoV-2
официално се нарича

COVID-19

CO - Corona
VI - Virus
D - Disease

www.microbenotes.com



Според Световната здравна организация (СЗО,) болестта, причинена от новия корона вирус, 2019-nCoV (SARS-CoV-2) вече официално се нарича COVID-19.

CO – означава Корона.

VI – означава Вирус.

D – означава болест.

19 – означава годината, в която е открит за първи път този патоген.

„Трябваше да намерим име, което не се отнася до географско местоположение, животно, индивид или група хора и което също може да се произнася и е свързано с болестта“, каза шефът на СЗО. „Освен това ни дава стандартен формат, който да използваме за всяка бъдеща епидемия от коронавирус.“¹

SARS-CoV-2

Проучвателната група за коронавируси (CSG) към Международния комитет по таксономия на вирусите, която е отговорна за разработването на официалната класификация на вируси и именуването на таксоните (таксономия) на семейство

¹ Тедрос Адханом Гебрейес, генерален директор на СЗО, обяви това във вторник 11.02.2020 г. на пресконференция в централата на СЗО в Женева.

Coronaviridae, оцени новия човешки щам, наречен временно 2019-nCoV. Въз основа на филогенезата, таксономията и установената практика, CSG официално признава този тежък остър респираторен синдром-свързан коронавирус като „сестрински“ на коронавирусите, предизвикващи тежкия остър респираторен синдром (SARS-CoVs), като го наименоват Тежък остър респираторен синдром коронавирус 2 (SARS-CoV-2)².

След първите съобщения за нов клъстер от инфекции, причинени от COVID-19 в град Ухан, провинция Хубей, Китай, в научните среди започна задълбочено търсене и значителна дискусия и несигурност за произхода на вируса, SARS-CoV-2. Заразяването със SARS-CoV-2 е широко разпространено в Китай, като положителните докладвани случаи са вече във всяка провинция. Към 24.02.20 г., в Китай има 77 042 потвърдени случая и около 2445 смъртни случая. Извън Китай има засегнати 28 държави с 1769 потвърден случая и 17 починали хора. Този официален брой докладвани случаи вероятно не е точен и е по-малък поради ограниченото съобщаване на леки и безсимптомно протичащи инфекции, и очевидно вирусът е способен на **ефективно предаване от човек на човек**. Поради възможността вирусът да се разпространи в страни с по-слабо развито здравеопазване, Световната здравна организация обяви **епидемията от COVID-19 за извънредна ситуация в областта на общественото здравеопазване от международно значение (PHEIC)**. В момента няма нито ваксини, нито специфично лечение за това заболяване.

Първичен произход на вируса SARS - CoV-2:

SARS-CoV-2 е седмият щам, принадлежащ към семейство *Coronaviridae*, за който е известно, че инвазира човешката популация. Три от тези вируси, SARS CoV-1, MERS и SARS-CoV-2, могат да причинят тежки заболявания; останалите четири, HKU1, NL63, OC43 и 229E, са свързани с проява на леки респираторни симптоми.

Началните проучвания за произхода и ранната еволюция на SARS-CoV-2 се базират на сравнителния анализ на наличните данни за геномната последователност на вируса. От тази гледна точка, съблюдавайки значими специфични характеристики в генома на SARS-CoV-2, се разиграват различни сценарии за възникването на тези специфични характеристики. Важно е да се отбележи, че този анализ дава доказателства, че SARS-CoV-2 **не е лабораторна разработка, нито целенасочено модифициран вирус**.

Съпоставянето на геномните секвенции на алфа- и бетакоронавирусите (семейство *Coronaviridae*), описано по-долу, определя две забележителни характеристики на генома SARS-CoV-2:

- въз основа на структурното моделиране и ранните биохимични експерименти, SARS-CoV-2 е приспособен да разпознава и да се свързва с ACE2 рецептора при човека;
- високо вариабилният протеин в шипчетата (S) на SARS-CoV-2 има многослойно (фуриново) разцепване на границата на S1 и S2 чрез вмъкване на дванадесет нуклеотиди.

Освен това, това събитие доведе до придобиването на три прогнозирани O-свързани гликани около мястото на многослойно разцепване.

² (Източник: DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.02.07.937862>) Първичният произход на SARS-CoV-2

Мутации в рецептор свързващия домен на SARS-CoV-2:

Рецептор свързващият домен (RBD) на протеините, разположени по шипчетата на SARS-CoV и SARS-свързани коронавируси, е най-вариабилната част от генома на вируса. Шест остатъци в RBD са критични за свързването с човешкия ACE2 рецептор и определят диапазона на възприемчивост на гостоприемника (host range). Използвайки като отправна точка за сравнение щам *Urbani* на SARS-CoV, тези 6 остатъка на RBD са: Y442, L472, N479, D480, T487 и Y4911. Съответстващите остатъци в SARS-CoV-2 са: L455, F486, Q493, S494, N501 и Y505. Пет от тези шест остатъка са мутирали при SARS-CoV-2 в сравнение с неговия най-близък щам, RaTG13, изолат от прилепи *Rhinolophus affinis*, с който се наблюдава ~ 96% идентичност (Фиг. 1а). Въз основа на моделирането (Wan, Y., Shang, J., Graham, R., Baric, R. S. & Li, F. *Receptor recognition by novel coronavirus from Wuhan: An analysis based on decade-long structural studies of SARS. J. Virol.* (2020) doi:10.1128/JVI.00127-20) и биохимичните експерименти (Wu, F. et al., *A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. Nature* (2020) doi:10.1038/s41586-020-2008-3; Letko, M. & Munster, V. *Functional assessment of cell entry and receptor usage for lineage B β -coronaviruses, including 2019-nCoV. bioRxiv 2020.01.22.915660* (2020) doi:10.1101/2020.01.22.915660.), става ясно, че RBD на SARS-CoV-2 има висок афинитет за свързване към **ACE2 при хора, примати, порове, прасета и котки**, както и други видове с висок рецепторна хомоложност. За разлика от тях, този рецепторен домен на SARS-CoV-2 може да се свързва с по-малка ефективност с ACE2 при други видове животни, възприемчиви към групата на SARS вирусите, като гризачи и цвети.

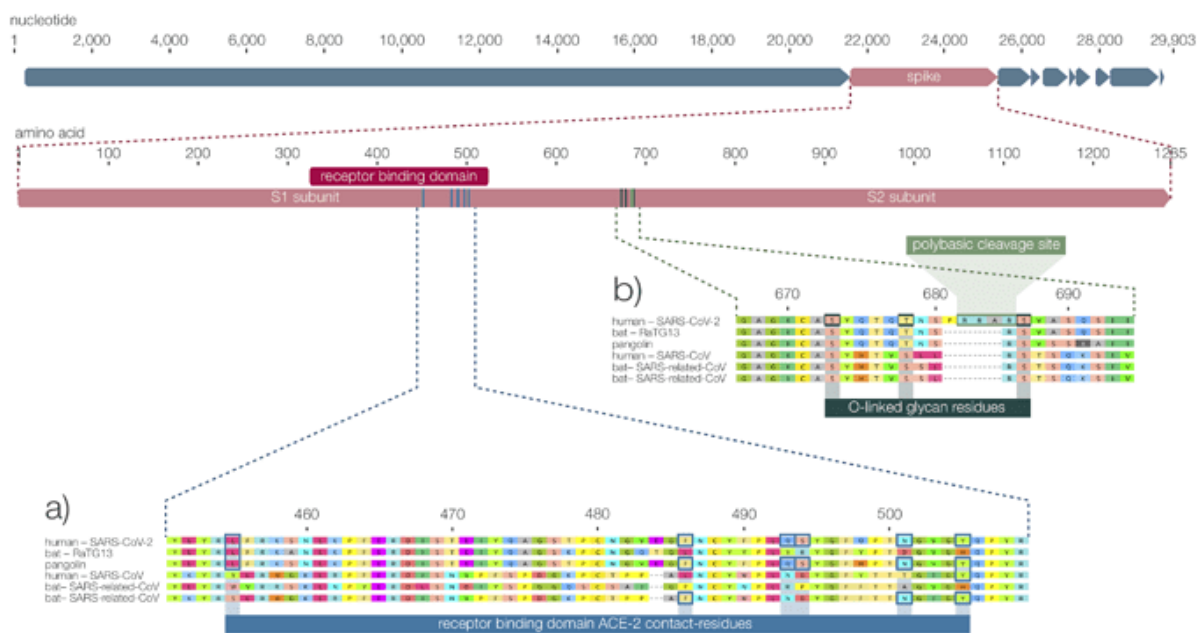
Фенилаланинът (F) в остатък 486 в протеина SARS-CoV-2S съответства на L472 в щам *Urbani* на SARS-CoV. По-специално, в експериментите на култивиране на SARS-CoV в клетъчни култури, L472 мутира до фенилаланин (L472F), което се очаква да бъде оптимално за свързването на RBD с човешкия ACE2 рецептор. Въпреки това, фенилаланин в тази позиция също присъства в няколко SARS-подобни CoV, изолирани от прилепи (Фиг. 1а). Въпреки че тези анализи предвиждат, че SARS-CoV-2 може да се свързва към човешкия ACE2 рецептор с висок афинитет, свързването не се предвижда да бъде оптимално. Освен това, няколко от ключовите остатъци в RBD на SARS-CoV-2 са различни от тези, описани по-рано като оптимални за свързване с човешки ACE2 рецептор. За разлика от тези изчислителни прогнозни модели, последните проучвания за връзката между RBD и ACE2 показват, че SARS-CoV-2 се свързва с висок афинитет към човешкия ACE2. Протеините върху шипчетата на SARS-CoV-2 изглежда са резултат от селекция върху човешки или човекоподобни ACE2 рецептори, осигуряващи друго оптимално място на свързване. Това е **силно доказателство в подкрепа на теорията, че SARS-CoV-2 не е продукт на генното инженерство.**

Място на многослойно разцепване и O-свързани гликани:

Втората забележителна характеристика на SARS-CoV-2 е прогнозното място на многослойното разцепване (RRAR) в протеините по шипчетата на вируса, точно в контактната точка на свързване на двете субединици на белтъка (S1 и S2), (Фиг. 1б). В допълнение към аргинина и аланина на мястото на разцепване, се включва пролин; по този начин, вмъкнатата последователност е PRRA (Фиг. 1б). Силното нагъване на белтъка, създадено при вмъкването на пролина, се предвижда да доведе до добавяне на O-свързани гликани към S673, T678 и S686, които обграждат мястото на многослойно разцепване. Не е наблюдавано такова **място на многослойно разцепване** в сродни бетакоронавируси от линия В и е **уникална характеристика на SARS-CoV-2**. Някои човешки

бетакоронавируси, включително HCoV-NKU1 (линия А), имат места на многослойно разцепване, както и O-свързани гликани в близост до мястото на разцепване на S1/S2.

Въпреки че функционалната последователност от мястото на многослойно разцепване в SARS-CoV-2 е неизвестна, експериментите с SARS-CoV показват, че генният инженеринг на такъв участък от S1 / S2 разцепването засилва сливането между клетките, но не влияе на навлизането на вируса. Местата на многослойно разцепване позволяват ефективно разцепване чрез фурин и други протеази и могат да бъдат придобити на местата на свързване на двете субединици на протеина хемаглютинин (HA) на вируса на птичия грип при условия, които са отговорни за бързото реплициране и трансмисия на вируса (напр. висока гъстота на птичи популации). HA служи за сливането на клетките и вируса, като подобна функция изпълнява и коронавирус S протеин. Достигането на мястото на многослойно разцепване от HA на птичия грип, чрез инсерция или рекомбинация, превръща птичия грипен вирус от нископатогенен във високопатогенен щам. Достигането до местата на многослойно разцепване от грипния вирус HA е симулирано и след многократно принудително препасиране на клетъчни култури или през животински гостоприемници. По подобен начин, авирулентният щам на вируса на нюкасълската болест става силно патогенен по време на серийно препасиране в птици чрез постепенно придобиване на многослойно място на разцепване в мястото на свързване на субединиците на синтезияния протеин. Потенциалната функция на трите O-свързани гликани е по-малко ясна, но те биха могли да създадат „муцин-подобен домен“, който да защити потенциалните епитопи или ключовите остатъци от протеина върху шипчетата на SARS-CoV-2. Необходими са биохимични анализи или структурни изследвания, за да се определи дали се използват предвидените O-свързани гликанови сайтове или не.



Фиг. 1. (а): Мутации в контактни остатъци от протеина по шипчетата на SARS-CoV-2. Този протеин на SARS-CoV-2 (отгоре) е подравнен и съпоставен спрямо най-близко свързаните SARS-подобни CoVs и SARS-CoV-1. Ключовите остатъци в този протеин, които отговарят за контакта с рецептора за ACE2, са отбелязани със сини квадратчета както в SARS-CoV-2, така и в SARS-CoV Urbani щам. (б) Придобиване на място за многослойно разцепване и O-свързани гликани. Мястото на многослойно разцепване е маркирано в сиво с трите съседни прогнозни O-свързани гликани в синьо. Както мястото на многослойно разцепване, така и O-свързаните гликани са уникални за SARS-CoV-2 и не са били наблюдавани по-рано в бетакоронавирусите на линия В.

Показаните последователности са от NCBI GenBank, номера на публикуване: MN908947, MN996532, AY278741, KY417146, MK211376. Секвенциите на панголин коронавируса са консенсус генерирани от SRR10168377 и SRR10168378 (NCBI BioProject PRJNA573298).

Теории за произхода на SARS-CoV-2

Авторите на част от проучванията изказват **теорията за невъзможността SARS-CoV-2 да се е появил чрез лабораторно манипулиране на съществуващ SARS коронавирус**. Както бе отбелязано по-горе, **рецепторният свързващ домен (RBD) на SARS-CoV-2 е оптимизиран за свързване с човешки ACE2 рецептор с ефективен свързващ механизъм, различен от този, който е бил прогнозиран**. Освен това, ако е извършена генетична манипулация, човек би очаквал, че ще бъде използвана една от няколкото обратни генетични системи, налични за бетакоронавирусите. Това обаче не е така, тъй като генетичните данни показват, че SARS-CoV-2 не е получен от нито един от използваните по-рано линии на вируса. Вместо това, се предлагат **два сценария**, които правдоподобно могат да **обяснят произхода на SARS-CoV-2**:

- естествена селекция в гостоприемник, който не е човек, преди зооотичен трансфер;
- и
- естествена селекция в човешки гостоприемник след зооотичен трансфер.

Също така се обсъжда дали подбор по време на препасирането в клетъчните култури може да доведе до същите наблюдавани характеристики.

Селекция в животински гостоприемник:

Тъй като много от ранните случаи на COVID-19 са свързани с пазара на морски дарове и диви животни в град Ухан, Китай, възможно е животинският източник на вируса да е циркулирал на този пазар и преди. Като се има предвид приликата на SARS-CoV-2 с SARS-подобни CoVs при прилепите, по-специално щама RaTG13, **вероятно е прилепите да служат като резервоарни гостоприемници за SARS-CoV-2**.

Важно е обаче да се отбележи, че предишните огнища на бетакоронавирусите при хора **включват пряко излагане на животни, различни от прилепите, включително цивети (SARS) и камили (MERS)**, които пренасят вируси, които са генетично много подобни на SARS-CoV-1 или MERS-CoV, съответно. По аналогия вирусите, тясно свързани със SARS-CoV-2, могат да циркулират в един или повече животински гостоприемници. Първоначалните анализи показват, че индивиди от **Малайски люспеник (*Manis javanica*)**, незаконно внесени в провинция Гуандун, са положителни за коронавирус (CoV), подобен на SARS-CoV-2. Въпреки че щамът RaTG13 при прилепи остава най-близкият спрямо SARS-CoV-2 според геномния анализ, CoV при малайския люспеник е идентичен на SARS-CoV-2 при всичките шест ключови RBD остатъци (Фиг. 1).

Все още обаче не е идентифициран CoV от панголин (люспеник), който да е достатъчно генетично подобен на SARS-CoV-2, за да обуслови пряката човешка инфекция. В допълнение, панголин CoV не носи място на многослойно разцепване. За да може вирусът-предшественик да придобие мястото на многослойно разцепване и мутации в протеина върху шипчетата на вируса, подходящи за свързване с човешки ACE2 рецептор, животинският гостоприемник вероятно ще трябва да бъде представен с висока гъстота на популацията - за да позволи естествения подбор да протича ефективно - и ACE2 гена да е подобен на човешкия ортолог. **По-нататъшното охарактеризиране на панголин CoVs и други животински, подобни на SARS-CoV, вируси, следва да бъде приоритет за общественото здраве**.

Скрита адаптация към човешки гостоприемници:

Възможно е също така прародител на SARS-CoV-2 да прескочи от животно към човек, като описаните по-горе геномни особености са придобити чрез адаптация при последващо предаване и препасиране на вируса от човек на човек. Предполага се, че след като тези адаптации бъдат придобити (заедно или на серия), това ще даде възможност за разпространение на огнището, създавайки достатъчно голям и необичаен кълстер от пневмонии, за да се задейства системата за надзор, която в крайна сметка откри този щам на вируса.

Всички геноми на SARS-CoV-2, секвенсирани досега, имат добре адаптирани RBD и многоослойно разцепване и така са получени от общ прародител, който има тези характеристики. Наличието на RBD в панголините (люспениците), което е много подобно на това в SARS-CoV-2, означава, че това вероятно вече е налице във вируса, който е прескочил към хората, дори ако все още нямаме точния животински вирусен предшественик. Това оставя мястото на многослойно разцепване и самото разцепване да се случи по време на предаването на вируса от човек на човек. Следвайки примера с HA гена на грип А вирус, е необходимо специфична инсерция или рекомбинация, за да се даде възможност за появата на SARS-CoV-2 като епидемичен патоген.

Прогнозите за времето на най-скоро срещания общ прародител (tMRCA) на SARS-CoV-2, използващи наличните в момента данни за последователността на генома, сочат за **първа поява на вируса в края на ноември, началото на декември 2019, съвместими с най-ранните ретроспективно потвърдени случаи**. Следователно, този сценарий предполага **период на нерегистрирано предаване на вируса при хора**, който е между първоначалният зооотичен трансфер и придобиването на мястото на многослойно разцепване. Достатъчна възможност за възникване на епидемия би била, ако е имало много предишни зооотични събития, изразяващи се в къси вериги на предаване на вируса от човек на човек (така наречените „затихващи вериги“/“stuttering chains“) за продължителен период. Това е по същество **ситуацията за MERS-CoV на Арабския полуостров**, където всички случаи на хора са резултат от **многократни прескачания на вируса от едногърби камили**, при които щамът на вируса предизвиква единични инфекции или къси вериги на предаване на вируса, които в крайна сметка отзвучават. **Към днешна дата след 2499 случая за 8 години не се е появила адаптация на вируса към човека, която да позволи на MERS-CoV да се наложи в човешката популация.**

Как бихме могли да тестваме дали скритото разпространение на SARS-CoV-2 е направило възможна човешката адаптация и възприемчивост към вируса?

Метагеномните изследвания на серумни проби от генетична банка могат да дадат важна информация, но предвид сравнително краткия период на вiremия може да бъде невъзможно да се открие ниско ниво на циркуляция на SARS-CoV-2 в исторически проби. Ретроспективните серологични изследвания потенциално биха могли да бъдат информативни и няколко такива проучвания вече са проведени. Едно от тях установи, че търговците на животни проявяват 13% серопозитивност към коронавируса, докато други отбелязват, че 3% жители на село в Южен Китай са серопозитивни към тези вируси. Интересното е, че 200 жители на Ухан не са показали серопозитивен резултат към коронавируса. От тези проучвания не става ясно дали тази серопозитивна реакция се дължи на предишно прекарани инфекции със SARS-CoV-1 или -2. Трябва да се проведат допълнителни ретроспективни серологични изследвания и анализ на резултатите, за да се определи степента на предишно излагане на хора на бетакоронавируси в различни

географски области, по-специално като се използват специфични анализи за разграничаване на многобройните щамове бетакоронавируси.

Селекция на вируса по време на препасиране:

Основни проучвания, включващи заразяване с коронавируси, подобни на SARS изолати от прилепи, на клетъчни култури и/или върху опитни животни, се извършват от много години в множество лаборатории по света с ниво на биосигурност 2 BSL-2. Има и документирани случаи на лабораторно заразяване с SARS-CoV-1 на лабораторни служители, работещи в лаборатории с ниво на биосигурност BSL-2. Ето защо трябва да не бъде изключвана възможността за умишлено или неволно освобождаване на SARS-CoV-2. На теория е възможно SARS-CoV-2 да придобие наблюдаваното мутационно място на RBD по време на адаптация на вируса и при култивирането му в клетъчните култури, както беше наблюдавано в проучвания с SARS-CoV и MERS-CoV. Придобиването на мястото на многослойно разцепване или O-свързани гликани – ако е функционално – **противоречи на този сценарий**. Нови места на многослойно разцепване са наблюдавани само след продължително препасиране на нископатогенния вирус на птичия грип в клетъчни култури или в опитни животни. Освен това, генерирането на SARS-CoV-2 чрез клетъчна култура или чрез животни ще изисква предварително изолиране на прогенитарен вирус с много високо генетично сходство. Следващото генериране на място на многослойно разцепване ще изисква интензивна програма за адаптиране и препасиране на вируса в клетъчни култури или животни с ACE-2 рецептор, подобен на този при хората (например порове). Спорно е също дали генерирането на O-свързани гликани би се случило при преминаване на вируса в клетъчните култури, тъй като такива мутации обикновено предполагат участието на имунна система, която не присъства *in vitro*.

Заклучения:

В разгара на заболяването COVID-19, което създаде глобалната спешна ситуация в областта на общественото здраве, е разумно да се отдаде основно значение на произходът на епидемията. **Подробното разбиране за това как животински вирус прескача междувидовите граници, за да зарази и засегне човешката популация толкова инвазивно, ще помогне предотвратяването на бъдещи зоонотични събития и вземането на своевременни мерки за превенция и борба с тази епидемия.** Например, ако SARS-CoV-2 предварително се адаптира в друг животински вид, тогава сме изложени на риск от бъдещи повторни появи, дори ако настоящата епидемия е контролирана. За разлика от това, ако адаптивният процес, който се описва в многото научни разработки по темата, се е случил при хора, тогава дори и да се повтори зоонотичен трансфер, е малко вероятно да има риск за населението, освен ако не се появят същите серии от мутации. В допълнение, идентифицирането на най-близките видове възприемчиви на SARS-CoV-2 животни значително ще подпомогне проучванията за етиологията на вируса. Всъщност наличието на геномната секвенция на щам RaTG13, изолиран от прилепи, улесни сравнителния геномен анализ, помагайки за разкриване на ключовите мутации в RBD, както и установяване на мястото на многослойно разцепване.

Описаните тук геномни характеристики могат отчасти да обяснят инфекциозността и възможността за преносане на SARS-CoV-2 при хора. **Въпреки че геномните доказателства не подкрепят идеята, че SARS-CoV-2 е лабораторна разработка, в момента е невъзможно да се докажат или опровергават другите теории за произхода му, и не е ясно дали бъдещите данни ще помогнат за разрешаването на този проблем.** Идентифицирането на непосредствения животински източник и получаване на секвенирания геном на вируса са най-информативният начин за разкриване на етиологията на SARS-CoV-2. Освен това би било полезно да се получат повече генетични и

функционални данни за вируса, включително експериментални проучвания за свързване на рецепторите и ролята на полибазното разцепване и прогнозиране O-свързани гликани. Идентифицирането на потенциален междинен гостоприемник на SARS-CoV-2, както и секвениране на генома на вирусни щамове от предходни инфекции, включително тези, които не са свързани с пазара на Ухан, също би било много информативно.

Независимо от възникването на SARS-CoV-2, непрекъснатото наблюдение на пневмонията при хора и животни е от изключително важно значение.

От своя страна ЦОРХВ продължава да следи ситуацията с разпространението на новия коронавирус и своевременно ще информира потребителите, компетентните институции и всички заинтересовани страни.



Други научни становища и актуална информация от областта на здравето, хуманното отношение и благосъстоянието на животните, антимикробната резистентност, както и оценка на риска по цялата хранителна верига може да намерите на сайта на Центъра за оценка на риска по хранителната верига:

<http://corhv.government.bg/>

<http://corhv.government.bg/?cat=28>

<http://corhv.government.bg/?cat=27>

<http://corhv.government.bg/?cat=71>

Източници:

- SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) Sequences; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/sars-cov-2-seqs/>
- The Proximal Origin of SARS-CoV-2; Novel 2019 coronavirusCoV-2019 Evolutionary History; Kristian G. Andersen^{1,2*}, Andrew Rambaut³, W. Ian Lipkin⁴, Edward C. Holmes⁵;
- The Proximal Origin of SARS-CoV-2 ChineseSummary.pdf (198.5 KB)

ИЗГОТВИЛИ:

Красимира Захаријева, главен експерт в отдел ЗРЖ към дирекция ОРХВ

Д-р Мадлен Василева, началник отдел ЗРЖ към дирекция ОРХВ

24.02.2020 г.