

МУТАЦИИ И ВАРИАНТИ НА КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2, ПРИЧИНИТЕЛ НА COVID-19

Доц. д-р Лъчезар Карагъзов
Софийски университет „Климент Охридски“

Резюме. През 2020 година коронавируса SARS-CoV-2 предизвика пандемия с тежки последици за много страни. Кратко е описан жизненият цикъл на вируса. Обърнато е внимание, че размножаването на вирусния генетичен материал е съпроводено с възникването на мутации, което води до появяването на нови вирусни варианти. Вирусните варианти могат да се различават по своята ефективност да заразяват, да се разпространяват, по тежестта на болестта, която предизвикват, и по способността да се използват от имунитета, придобит срещу вируса. Разгледани са най-важните SARS-CoV-2 варианти, които са се появили досега. Подчертава се необходимостта от глобално проследяване на възникването на нови варианти и бързата и масова ваксинация за справяне с пандемията.

Ключови думи: коронавируси; варианти на SARS-CoV-2; варианти повод за тревога; нови варианти

Съкращения:

CoV – coronavirus, коронавирус

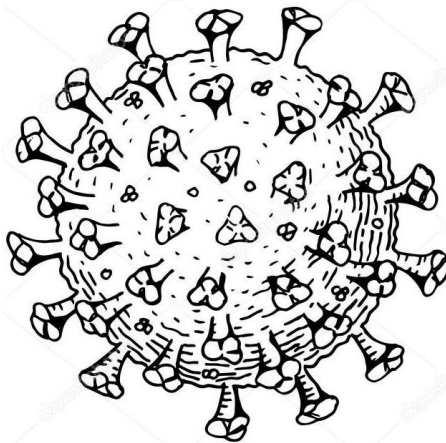
S-протеин – спайк (spike) протеин, продукт на S-гена

Въведение

Изучаването на коронавирусите има сравнително кратка история. Обединяването им в една група и тяхното име се дължи на характерните шипчета по повърхността на вирусните частици, което под електронен микроскоп им придава вид, наподобяващ слънцето с неговата корона (според други – наподобява царска корона) (фиг. 1).

Коронавирусите поразяват епитела на дихателните и храносмилателните органи при птици и бозайници; частиците им имат липидна обвивка и съдържат като генетичен материал едноверижна РНК (Almeida et al. 1968). Коронавирусите имат по-голям геном от другите РНК вируси. Например геномът на вируса на полиомиелита има 7500 рибонуклеотида (РНК букви), а на бяса – 12 хиляди. При SARS-CoV-2 геномът се състои от 30 хиляди РНК букви, които кодират 26 протеина (Wu et al. 2020).

Интересът към коронавирусите нарасна силно след 2002, когато вирус прескача видовата бариера. Тогава в Южен Китай избухва епидемия от SARS



Фигура 1. Повърхност на вирусната частица на SARS-CoV-2 (скица). Три молекули на спайк-протеина (S-протеина) изграждат едно шипче, една вирусна частица има около 90 шипчета (Bar-On et al. 2020)

(Severe acute respiratory syndrome, тежък остър респираторен синдром, ТОРС). Епидемията е ограничена до няколко хиляди души, продължава около година и е предизвикана от вируса SARS-CoV (SARS-CoV-1). Вирусът произхожда от подковоноси прилепи; пренасянето му към хората става с участието на междинен гостоприемник между прилепите и човека.

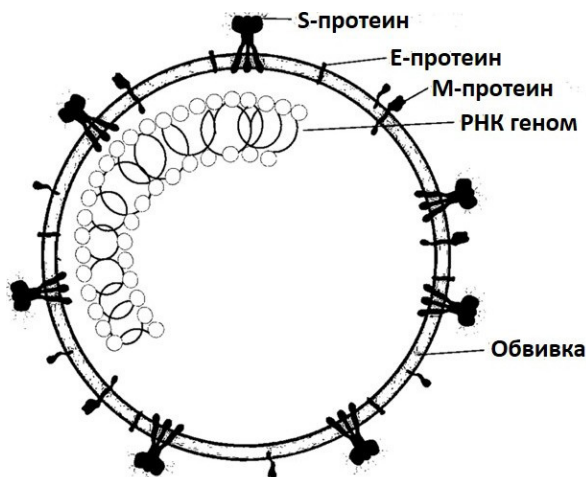
През 2012 се появява смъртоносна близкостоична инфекция MERS (Middle East respiratory syndrome). Вирусът е MERS-CoV, хората се заразяват от камили, но за щастие, заразата трудно се предава от човек на човек.

В края на 2019 идва ред на SARS-CoV-2 – вирус, сроден на SARS-CoV-1. В град Ухан, Китай, той предизвиква COVID-19 (Coronavirus disease 2019, коронавирусна болест 2019). Инфекцията бързо достига повечето страни в света и в началото на 2020 се превръща в пандемия (Perlman 2020).

Размножаване на коронавируса SARS-CoV-2 в клетките

Структурата на вирусната частица на SARS-CoV-2 е пределно проста (фиг. 2).

Единична едноверижна РНК молекула носи генетичната информация, която е достатъчна, за да могат в заразената клетка да бъдат направени нови вирусни частици. Вирусът има двойна липидна обвивка с трансмембранни протеини, един от които изгражда шипчетата (англ. spikes). Всяко шипче е тример, изградено е от три молекули спайк протеин (S-протеин, spike protein, S-protein).



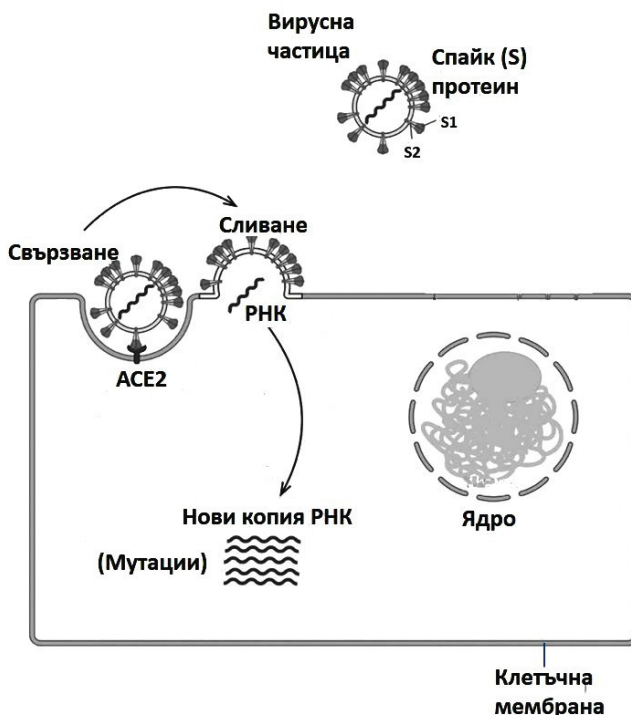
Фигура 2. Структура на коронавируса SARS-CoV-2. Показани са протеините по повърхността на вирусната частица: спайк (S), мембранен (М) и Е-протеин. Вирусът е обвит от двоен липиден слой; геномът е представен от едноверижна РНК молекула, съставена от 30 хиляди РНК букви (рибонуклеотиди)

Вирусната частица предизвиква COVID-19, след като попадне в дихателната система – например през носа, и зарази някоя от епителните клетки. За да стане заразяването, вирусът трябва първо да се прикрепя към клетката гостоприемник. Структурите по повърхността на клетките, към които вирусните частици се прикрепят, се означават като рецептори. При коронавируса рецепторите са различни трансмембрани белтъци, обикновено пептидази. Например клетъчният рецептор на SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 е пептидазата ACE2 (ангиотенсин конвертиращ ензим 2), а пептидазата DPP4 (дипептидил пептидаза 4) е клетъчният рецептор на MERS-CoV.

Прикрепянето на коронавируса към клетъчния рецептор става с помощта на шипчетата. Шипчето изпълнява две различни функции. Първо то се свързва с рецептора. После шипчето променя формата си, което предизвиква сливане между клетъчната мембрана и липидната обвивка на вируса. След сливането (фузията) вирусната РНК попада в клетката (Huang et al. 2020).

В цитоплазмата на клетката вирусната РНК инструктира рибозомите да започнат да синтезират вирусни белтъци (виж Baltimore 1971). Първият протеин, който се синтезира, е верига от 16 белтъка, съединени заедно (полипротеин). Един от тези белтъци е протеаза, която къса връзките в полипротеина и освобождава отделните белтъци, за да могат те да изпълняват своята роля (Corum and Zimmer 2020).

Най-отговорната задача на вирусните белтъци е да осигурят образуването на нови копия от вирусната РНК (фиг. 3).



Фигура 3. Заразяване на клетката от SARS-CoV-2. Показани са първите етапи от жизнения цикъл на вируса – свързване на S-протеина с клетъчния рецептор ACE2 и сливането на обвивката на вируса с клетъчната мембрана.

Вирусната РНК се размножава в цитоплазмата, някои от новите копия са с грешки (мутации)

Нови вирусни частици се появяват в клетката едва 10 часа след заразяването. Готовите вирусни частици излизат от клетката чрез процес, който наподобява пъпкуване. При коронавируса една инфектирана клетка произвежда до хиляда нови вирусни частици (Fehr and Perlman 2015; Bar-On et al. 2020).

Намногожаването на вирусната РНК води до мутации

Синтезирането на нови копия вирусна РНК става с помощта на ензима РНК репликаза (РНК зависима РНК полимераза). Когато РНК репликазата

синтезира РНК, тя неизбежно прави малки еднобуквени грешки. Например вместо една РНК буква във веригата се включва друга буква. Или което е по-рядко, няколко РНК букви изпадат и се получава делеция. Възможно е вмъкването на букви (инсерция). Всяка грешка, направена по време на синтезата на РНК, е мутация.

Характерно за всички РНК съдържащи вируси е, че при тях мутациите са чести (Duffy 2018). От РНК вирусите коронавируса имат най-голям геном. Коронавирусите имат ензим (3'-5' екзорибонуклеаза, nonstructural protein 14), който поправя грешки, осигурява стабилност на кода, поради което при коронавируса честотата на мутации е относително малка.

Отборът създава варианти на коронавируса

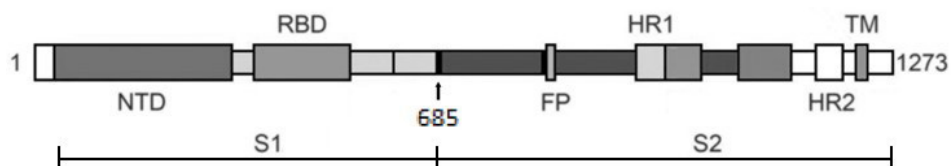
Някои точкови (еднобуквени) мутации са синонимни. Те не променят аминокиселината в белтъка, който се синтезира (кодът е изроден). Други мутации обаче променят кода и една аминокиселина се заменя с друга (Hadjiolov et al. 1976). В повечето случаи такива промени са вредни за вируса; тези мутации не се разпространяват. Една аминокиселинна замяна обаче може да е благоприятна и да дава предимство. С времето „подобрените“ вируси ще заразяват повече клетки и хора, а мутацията ще се разпространява по-широко. Това е отбор по Дарвин – приспособените оставят по-многобройно потомство.

Така при вирусите възникват нови специфични варианти, характеризиращи се с една благоприятна мутация или с мозайка от такива мутации. (Не е изключение един вариант да се нарече щам, въпреки че този термин предполага по-големи генетични различия, водещи до значителни разлики в характеристиките.)

При днешното дифузно разпространение на заразата болните от COVID-19 в една област не е изключено да са заразени от различни генетични варианти на SARS-CoV-2. Един от вариантите може да започне да преобладава, и това е знак, че този вариант е по-приспособен и възможно – по-опасен за хората.

Срещу SARS-CoV-2 организмът създава имунитет

Оръжието на организма на човека срещу SARS-CoV-2 е придобитият имунитет, който се получава при заболяване от COVID-19. Иммунната реакция на организма е насочена главно срещу спайк протеина (S-протеина), белтък от повърхността на вирусната частица (фиг. 2). Това е сложен белтък с две субединици и няколко домена (самостоятелни пространствени и функционални участъци) (фиг. 4). Неговата роля в първите етапи от заразяването на клетките е определяща.



Фигура 4. Схема на структурата на S-протеина. Съставен от 1273 аминокиселини, модифициран със захарни остатъци (гликопротеин).
Две субединици – S1 и S2

Субединицата S1 (остатъци 14-685) определя свързването на вирусната частица с рецептора ACE2. Домени: NTD – N-краен, и RBD – рецептор-свързващ домен.

Субединицата S2 (остатъци 686 – 1273) определя сливането на мембраните на вируса и клетката. Домени: FP – пептид на фузията; HR1 и HR2 – хепта-повтори; TM COVID трансмембранен домен (Wrapp et al. 2020; Huang et al. 2020).

S-протеинът на шипчетата е територията, където се води своеобразна „надпревара във въоръженията“. Организмът създава антитела срещу шипчетата, за да се бори с инфекцията. Епидемията се ограничава. Вирусът отговаря с нови „подоброени“ варианти на спайк протеина, които заразяват по-ефективно или успяват да се изплъзнат от антителата.

Антителата срещу спайк протеина се изработват от някои от клетките на имунната система. Всяка антитяло-синтезираща клетка произвежда много молекули антитела, но само от един вид. Това антитяло „атакува“ само един специфичен участък на спайк протеина (наричан епитоп или антигенна детерминанта). Иmunните клетки в организма са много. По този начин срещу спайк протеина организмът изработва не едно, а набор от антитела (поликлонални антитела). Поликлоналните антитела разпознават и се свързват с различни участъци от S-протеина и го неутрализират. Съществуването на неутрализиращи антитела в кръвта ефективно пази от развиването на ново заболяване. Тяхното съдържание обаче постепенно намалява с времето. Това не значи, че организмът не е защитен. В тялото остават имунни клетки, които имат памет за имунния отговор. Ако настъпи повторна инфекция, те се активират и отново произвеждат същия набор от неутрализиращи антитела. Изследванията показват, че поне за седем месеца (а може би и за много по-дълго) рискът от повторно заболяване от COVID-19 е минимален (Pilz et al. 2021; Hall et al. 2021).

Антитела за имунотерапия

В кръвта на повечето хора, прекарали COVID -19, поне пет месеца циркулират достатъчно поликлонални антитела срещу S-протеина. Ако на

сериозно болен се влее кръвна плазма от преболедевал, може да се наблюдава подобряване на състоянието.

Подобен ефект имат и моноклоналните антитела. Клетките, които изработват антитела, могат да се култивират поединично. Те създават антитела с точно определена специфичност (моноклонални антитела). Срещу спайк протеина има няколко моноклонални антитела, които фармацевтичните фирми произвеждат. Самостоятелно или в комбинация те имат доказан ефект при лечението на COVID-19.

Ваксини

Ваксинирането е профилактика. Това е начин да се накара организъмът да произведе антитела, без в действителност да е бил болен от COVID-19. Всички ваксини, които са разработени и са в употреба, използват спайк протеина като имуноген. Ваксинацията обаче не е със самия спайк протеин; технически това не е просто. Ето защо се използва околен път – за кратко организъмът на ваксинирания сам произвежда спайк протеин, за да могат да се образуват антитела.

За целта се използват две различни технологии. При едната ваксинацията е с информационна РНК (иРНК), която е опакована в липидни наночастици, за да може да проникне в клетите. иРНК носи информацията за синтеза на спайк протеина, която се използва от рибозомите на клетката.

Другата технология е така наречената векторна технология. Използват се аденовируси – вид ДНК съдържащи вируси. В ДНК на вируса един от гените, необходим за размножаването на вируса, е заменен с гена на спайк протеина. Такъв модифициран аденовирус става преносител (вектор) на информация. Той заразява клетките, неговата ДНК влиза в ядрата. Там ядреният ензим ДНК зависима РНК полимеразата синтезира съответната иРНК за синтеза на спайк протеин.

В последно време през успешни клинични изпитания преминават и няколко белтъчни ваксини (Dolgin 2021). При тях като имуноген се използва спайк протеин, който е произведен от еукариотни клетки. Използват се клетки от бозайници, дрожди, а като най-подходящи могат да се окажат някои клетки от насекоми (пеперуди). Това се налага, защото спайк трябва да получи подходящо модифициране със захари, което не може да стане, ако продуцентите са бактерии.

Потенциален недостатък на лечението с моноклонални антитела и на ваксините е, че те (засега) са направени на основата на кода на първите варианти от Ухан. В този случай е възможно при среща с нов вариант да има усложнения. Някое от моноклоналните антитела може да не се свързва със спайк на новия вариант, или ваксините да не защитават така добре след заразяване с този вариант (за примери виж таблица 1). Медикаментозното лечение няма тези ограничения.

Лекарства срещу коронавируса SARS-CoV-2

Вирусите са вътречлетъчни паразити. Преобладаващата част от ензимите, които те използват през жизнения си цикъл, принадлежат на клетката гостоприемник. В този случай, за да се забави или спре вирусната инфекция и да се даде време на организма да изработи антитела, се търсят ензими и процеси, които са специфични за вируса.

При коронавируса има възможност да се попречи на синтезирането на РНК на вируса. Това прави „Ремдесивир“ – първият антивирусен препарат, върху който бяха съсредоточени много надежди, разработен първоначално срещу вируса на хепатит С. Има действие срещу няколко вируса с РНК като генетичен материал, включително Ебола и коронавируси. Ремдесивирът по химична структура прилича на една от РНК буквите, с които кодът е записан. Вирусът бърка буквите, включва ремдесивир в кода, но не може да сглоби текста на своята генетична информация по дължина. Прилага се на болни чрез интравенозно вливане, което е неудобство. Успехът на този препарат е ограничен (WHO 2020).

Нов подобен препарат е „Молнупиравир“, който по структура също прилича на една от РНК буквите. Молнупиравирът се включва в текста на РНК кода, но кодът вече не може да се презаписва точно. Получават се масови мутации и промяна на аминокиселини във важни вирусни протеини. Такава катастрофа от грешки вирусът не може да издържи. Важно предимство на това лекарство е, че то може да се приема през устата (Mole 2021).

Друг механизъм на лечение предлага препаратът „Паксловид“, който също може да се приема като хапчета (Edwards 2021). Паксловид е инхибитор на главната протеаза на SARS-CoV-2 (nonstructural protein 5), която къса единайсет места в полипротеина.

Вариантите с мутации в S-протеина носят неизвестност

В началото на пандемията много специалисти се надяваха, че масовата ваксинация срещу COVID-19 с ваксините, които тогава се разработваха, успоредно със значителния брой преболеждали ще доведе до създаване в общността на колективен (стаден) имунитет и до затихване на заразата.

Подобна възможност съществува и сега. Може обаче да се окаже, че за постигане на целта ще бъдат необходими повече и по-продължителни усилия, защото трябва да се държи сметка за природата на SARS-CoV-2 (Mascola et al. 2021; Krammer 2021; Focosi and Maggi 2021). Вирусът „иска“ да остане да съществува. Неговото „оръжие“ са мутациите и способността за еволюция. Появяват се нови варианти. Някои от вариантите се разпространяват по-бързо. Те постепенно изместват старите варианти и започват да се наблюдават при все по-голяма част от случаите. Всяко родословие от вирусни частици, което по-ефективно

се свързва с клетъчния рецептор, по-лесно влиза в клетката, отделя се в по-голямо количество при говор или предизвиква по-продължително заболяване, е по-приспособено и ще заразява повече хора.

Вариантът D614G

SARS-CoV-2 започва да заразява хора в края на 2019 година. Тогава S-протеинът още не е бил нагледен достатъчно добре към човешкия рецептор ACE2. Очаквано, първата регистрирана мутация в S-протеина е станала в Ухан още през януари 2020. Това е замяната D614G (за начина на представяне на аминокиселинните замени при белтъците, виж приложението). Тази замяна е в S1 субединицата на спайк протеина (фиг. 4). Замяната на аспартат 614 с глицин прави връзката шипче-ACE2 по-здрава и помага на вирусите от това родословие да се разпространяват по-добре. Сега тази мутация преобладава навсякъде по света.

По-късно се появяват варианти с други мутации в S-протеина на SARS-CoV-2. Някои от тези варианти са с повишена способност да избягват взаимодействие с някои от неутрализиращите антитела, изработвани от човешкия организъм (Focosi and Maggi 2021).

Огнище на зараза 5

Съществува и друга опасност. Клетъчните рецептори, такива като ACE2, са видово специфични. Поради това всеки коронавирус има определен кръг от гостоприемници, които заразява. Промени в S-протеина могат да променят гостоприемниците. Без съмнение, една промяна в S-протеина е позволила прескачането през 2019 година на определен коронавирус от животински вид, най-вероятно от подковоноси прилепи, към човек (Cui et al. 2019; Zhukova et al. 2020).

Новите SARS-CoV-2 варианти могат да имат разширен кръг от гостоприемници. Ако сред тях попаднат домашни любимци (котки или кучета), това ще е нов източник на зараза и на мутации, което може сериозно да затрудни борбата с пандемията. Ето защо откритието, че човешкият SARS-CoV-2 заразява норки, предизвиква истинска уплаха.

През април – май 2020 в Нидерландия правят откритието, че в техните ферми за норки (животни, отглеждани заради ценната им кожа) става пренасяне на SARS-CoV-2 от хора към норки и обратно – от норки към хора (ECDC 2020). Дания е страната, в която най-масово се отглеждат норки (около 14 милиона), като фермите са главно в Северна Ютландия. Съответното изследване на хора и животни в Дания показва съществуването на пет огнища на зараза. Вариантите в тези огнища са уникални, не се срещат никъде другаде. По-лошо, всяко огнище има свои мутации и варианти. Вирусът в „Огнище 5“ е със значителни промени в S-протеина (виж таблица 1). Тази продължаваща и бърза

еволюция потенциално може да разшири кръга от бозайници, които се заразяват, може да компрометира ваксините, които вече се разработват, и да усложни хода на пандемията.

Следва унищожаване на норките (преди този случай, по настояване на защитниците на животните, отглеждането на животни заради кожата им е било планирано да се прекрати след 2024 година). Големи части от Ютландия са затворени. Днес вариантът от „Огнище 5“ вече не се среща.

Класифициране на вариантите на SARS-CoV-2

Изминали са 24 месеца от началото на еволюцията на вируса SARS-CoV-2. В генома са натрупани десетки мутации. Различията между отделните варианти на SARS-CoV-2 са много по-малки от 1%, но са достатъчни, за да могат да се разграничат родословията на вируса.

Един нов вариант може да е местен, възникнал у пациент от даденото място, но може да е привнесен отвън. По-голямата част от новите родословия, които се появяват, не се отличават особено от старите. Но някои може да са опасни за протичането на епидемията в страната. По цял свят от болните се изолира вирусна РНК, структурата на тази РНК се определя и се сравнява с първите варианти от Ухан от 2019/2020, които се означават като „последователност нула“. Резултатите за България се обявяват от Националния център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ, NCIPD).

В научната литература при означаване и групиране на новите варианти и родословия на SARS-CoV-2 цари разнообразие, като днес се използват няколко различни номенклатури. Широко е разпространена номенклатурата Pango. При нея се използва софтуерен пакет, позволяващ динамично идентифициране на новите варианти и причисляването им към някое от основните родословия – (A, B, B.1, B.1.1, B.1.1.7 и други). „Последователност нула“ е в родословие „A“ (Rambaut et al. 2020).

Здравната система във Великобритания използва специфична система за означаване на новооткритите варианти. Отбелязват се датата на идентифицирането и поредният номер. Дава се и оценка на варианта. Отначало един вариант е VUI (variant under investigation) – изследван вариант. Следва оценка на скоростта на разпространение, влиянието върху смъртността, способност да заразява преболедали или ваксинирани индивиди, промяна във възрастта на заразените. Тогава този вариант може да премине в групата VOC (variant of concern) – вариант, повод за тревога за общественото здраве. Подобна система на класификация се използва и в САЩ (CDC 2021). Свързан термин е „вариант от голямо значение“ (variant of high consequence), използван, ако ефективността на мерките за предпазване и лечение е значително намалена. Засега варианти от тази група няма (4 октомври 2021; CDC 2021) .

Начините на именуване на вариантите, които се използват от учените, за неспециалистите са сложни, объркващи и трудно се запомнят. Ето защо

вариантите на вируса доскоро се именуваха по мястото, където са открити за първи път. Така на широката публика стават известни вариантите „южноафрикански“, „индийски“, „непалски“ и т.н.

Разбираемо, никой не иска да бъде свързан с COVID-19 или с вариант на болестта. Така на държавата започва да се гледа с „лошо“ око – „китайски вирус“, „бразилски вариант“. Това подхранва омразата и недоверието към различното, чуждото. Властите дори не бързат да обявяват своите варианти, за да не се навреди на името на държавата.

В резултат на 31 май 2021 Световната здравна организация (СЗО) въведе букви от гръцката азбука за обозначаване на вариантите. Така те стават лесни за запомняне и удобни за журналисти, политици и здравни работници (научната номенклатура ще продължава да се използва в специализираните издания).

При използването на гръцките букви се взема под внимание и класификацията по степен на опасност. Вариантите VOC получават първите букви на гръцката азбука, като се започне от алфа, според времето на тяхното откриване. Досега има четири такива варианта. Вариантите, заслужаващи интерес, получават буквите след делта – от епсилон до края на азбуката. Ако преминат в категорията VOC, те ще запазят своята гръцка буква.

Варианти, повод за тревога

Четири са вариантите, даващи повод за тревога за общественото здраве (Mascola et al. 2021; Corum and Zimmer 2021). За характеристиката им виж таблица 1.

Таблица 1. Основни характеристики на вариантите на SARS-CoV-2, предизвикващи тревога (VOC) според Global Virus Network

Име според СЗО Pango родословие	Ключови замени в S-протеина	Място/дата на откриване	Важни признаци
Алфа B.1.1.7	Δ69/70, Δ144, N501Y, P681H	Великобритания декември, 2020	По-лесно се разпространява от вариантите 2019/2020. По-тежко протичане на болестта. Серум от преболедували или ваксинирани неутрализира вируса. През м. април 2021 има 100% разпространение в България.

Бета B.1.351	K417N, E484K, N501Y	Южна Африка декември, 2020	По-лесно се разпространява. Способността на серум от преболедали или ваксинирани да неутрализира вируса, е намалена. Някои моноклонални антитела не са ефективни. Не е доказан в България.
Гама P.1	K417T, E484K, N501Y	Япония/ Бразилия януари, 2021	Намалява способността на серум от преболедали или ваксинирани да неутрализира вируса. Някои моноклонални антитела не са ефективни. Не е доказан в България.
Делта B.1.617.2	Δ156/157, L452R, T478K, P681R	Индия октомври, 2020	По-бързо се разпространява от Алфа. Намалява способността на серум от преболедали или ваксинирани да неутрализира вируса. Някои моноклонални антитела не са ефективни. Първа засегната страна в Европа – Великобритания. През м. август 2021 вече преобладава и в България.
Огнище 5	Δ69/70, Y453F, I692V, S1147L, M1229I	Дания ноември, 2020	Заразява животни (норки) и хора. Изчезнал вариант

Забележки

1. Всички варианти със значение за общественото здраве в спайк протеина имат замяната D614G.

2. Δ (делта) – делеция на аминокиселина.

3. Някои родословия на алфа варианта имат допълнителни замени на аминокиселини в S-протеина.

4. През април 2021 в Индия се открива нов вариант – делта плюс – със спайк мутацията K417N. Не е ясно дали този вариант се разпространява по-лесно и измества делта.

5. За начина на записване на замените на аминокиселини при белтъците, виж приложението.

Данните, обновени в края на октомври 2021, са от:

Центъра за контрол на болестите, Атланта <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/cases-updates/variant-surveillance/variant-info.html>

Национален център по заразни и паразитни болести, София https://www.ncipd.org/index.php?option=com_k2&view=item&id=546:ncov-012020&lang=bg

„Алфа“. Известен като английски или британски вариант. Идентифициран в Кент, Югоизточна Англия (Wise 2020). Разпространява се по-бързо от варианта от Ухан. Болестта протича по-тежко. Причинява рязко покачване на случаите на COVID-19 във Великобритания. Серуми от преболеждали или ваксинирани успешно неутрализират вируса. Изследванията на Националния център по заразни и паразитни болести в София показват, че алфа е достигнал България (Кюстендил) преди края на 2020 г. След март 2021 г. алфа е единственият вариант, който се регистрира у нас (до появата на делта варианта). S-протеинът на този вариант е без аминокиселини 69 и 70. При някои от RT-PCR китовете за диагностика тази мутация пречи да се намножи (амплифицира) S-гена, един от трите маркерни гена. Амплификацията само на два от гените улеснява идентифицирането на алфа при заболялите от КОВИД-19.

„Бета“. „Южноафрикански“ вариант. Бързо разпространение. Намалява способността на серуми от преболеждали от друг вариант или ваксинирани да неутрализират вируса. При лечение някои моноклонални антитела не са ефективни. Среща се и извън Африка – в САЩ, в Европа (сериозно огнище имаше в Австрия), САЩ. Не е доказан в България. Правят се изследвания доколко съществуващите ваксини пазят заразените с бета от сериозно заболяване.

„Гама“. „Бразилски“ вариант. Открит е в Япония през януари 2021 при рутинно изследване на четирима пътници, завръщащи се от Бразилия. Нов вариант за Бразилия; разпространява се бързо, с по-голяма смъртност, намалена средна възраст на заболялите. В Манаус – град с население над 2 милиона, разположен на река Амазонка, гама причини сериозна епидемия, въпреки че населението масово е преболеждало от COVID-19 (Sabino et al. 2021). Гама бързо се разпространява в страната, здравната система не издържа, починалите само за месец март 2021 са 60 хиляди. Намалява способността на серуми от преболеждали или ваксинирани да неутрализират вируса. При лечение някои моноклонални антитела не са ефективни. Присъства в Европа, не е доказан в България.

„Делта“. „Индийски“ вариант. По-бързо разпространение от алфа. Намалява способността на серуми от преболеждали или ваксинирани да

неутрализират вируса. Някои моноклонални антитела не са ефективни при лечение. Великобритания е най-засегнатата страна в Европа. Данните от юни 2021 показват, че ваксинираните с две дози ваксина са 90% защитени от тежко протичане на COVID-19, причинен от делта.

През лятото на 2021 се съобщи за присъствието на делта в Плевен. Разпространението на този вариант у нас сега е повсеместно.

Ваксинирането и вариантите на S-протеина

Съществуващите векторни и мРНК ваксини (и бъдещите протеинови ваксини) се произвеждат, като се използва информацията за структурата на S-протеина на старите, „класически“ варианти от Ухан. Тези ваксини предизвикват в организма синтеза на поликлонални антитела. Съществува опасност между новите и старите варианти на S-протеина да има такива различия, че поликлоналните антитела срещу стария вариант да не са толкова ефективни срещу новия вариант. Тогава може да се случи, че новите SARS-CoV-2 варианти предизвикват COVID-19 при вече ваксинирани или преболеждали индивиди (виж случая в град Манаус, таблица 1).

Подобно е положението при моноклоналните антитела, които се използват за лечение. Моноклоналните антитела са насочени срещу една определена антигенна детерминанта (определен епитоп) на S-протеина. При някой нов вариант, който се различава само с една аминокиселина от стария, този епитоп може вече да не съществува.

Показателни са резултатите от анкета, направена сред епидемиолози през 2021 (Oxfam 2021). По-голямата част от тях смятат, че появата на нови варианти може да направи днешните ваксини неефективни. Може би скоро ще бъде необходимо ваксините да се преработят и да се направят нови.

Действително всеки вариант на вируса се отличава с собствена мозайка от мутации в S-протеина. Това може да обезкуражава. Но внимателният прочит на данните показва, че възможностите на S-протеина да се изменя, да се нагажда към човешкия организъм и да се променя имуногенно, не са безкрайни и се изчерпват.

За това говорят случаите на независимо възникване на едни и същи мутации в различни родословия, даже на различни континенти. Например замяната N501Y се среща в трите варианта – алфа, бета и гама. Делецията ΔH69/V70 се среща в Огнище 5 и в алфа. Замяната E484K се среща в два варианта – бета и гама и в някои от родословията на алфа. Това са примери за съществуването на конвергентна еволюция при SARS-CoV-2 – подобно на съществуването на крила при насекоми, птици и бозайници (прилепи).

Не трябва да се забравя, че бързото и масово глобално ваксиниране е начин да се ограничи вероятността за възникване на нови варианти. Опасността да се появи вариант, срещу който е нужно да се прави нова ваксина, става

по-малка, когато няма заразени милиони хора и нови мутации не възникват ежечасно,.

Тук се предвиждат няколко възможности. Едната е да се направи трета, бустерна ваксинация. Това ще създаде мощна защита от поликлонални антитела, която ще е достатъчна да спре познатите и бъдещите нови варианти. Друга възможност е да се създава ваксина за всеки нов вариант. Изказват се и мнения (Mascola et al. 2021), че трябва да се разработи една комбинирана, пан-SARS-CoV-2 ваксина, насочена срещу всеки от опасните варианти.

Бележка. Поради тяхното огромно значение за здравето и икономиката и за ускоряване и облекчаване на обмяната на информация публикациите по коронавируса и предизвикваните от тях заболявания са достъпни в интернет свободно, без ограничения.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Записване на замените на аминокиселини при мутантни протеини

Коронавирусът SARS-CoV-2 заразява горните дихателни пътища при хората и предизвиква заболяването COVID-19. През 2020 епидемията обхваща повечето страни в света и се превърна в пандемия. В последните месеци на 2020 се появиха няколко нови варианта на вируса, които станаха повод за тревога. Появяването на нови варианти на вируса се отразява не само в специализираните медицински издания, но и в популярни и широко достъпни материали. Вариантите се характеризират с промени в последователността на аминокиселините на спайк (S) протеина. Тези промени по правило се състоят в замяната на една аминокиселина с друга или в изпускането (делеция) на една или няколко аминокиселини.

Аминокиселинните последователности и обработката им е ежедневие за работещите с протеинови бази данни. Отбелязването на замените на аминокиселини за всички останали може да изглежда чудновато въпреки простите принципи, които се следват.

Отбелязването на мутациите в протеините става по следния начин. Първо се изписва аминокиселината в непроменения протеин, следва число за мястото на аминокиселината от началото на полипептидната верига (NH₂-края). Записът завършва с новата аминокиселина.

За имената на аминокиселините се използват еднобуквените им съкращения. Така, ако става дума за S-протеина на SARS-CoV-2, мутацията N501Y означава, че аспарагинът от място 501 е заменен с тирозин. Делеция (отсъствие) на една или няколко аминокиселини се отбелязва като del или Δ (делта, гръцка главна буква). Така ΔH69/V70 означава отсъствие на хистидин и валин от места 69 и 70.

При някои варианти на едно и също място се наблюдават две различни и независими промени. Възможността за такива промени в рамките на един

кодон е заложена в генетичния код (Hadjilov et al. 1976). Така например при едни варианти се наблюдава замяната на лизин с аспарагин (K417N), а при други – замяната на лизин с треонин (K417T). В подобни случаи се използва записът K417N/T.

За тези, които не са свикнали, еднобуквените символи на аминокиселините са затруднение. Освен това не е лесно да се запомнят. Маргарит Дейхоф ги използва в публикувания през 1969 „Атлас на белтъчната последователност и структура“ (Dayhoff 1969). Сега тези означения са приети при записите на аминокиселинната (първичната) последователност на белтъците в базите данни и за обозначаване на замените на аминокиселини при мутации.

При обозначаване на структурата на къси пептиди и в обикновен текст имената на аминокиселините се съкращават до три букви. Например: Аланин – Ала, Пролин – Про, Триптофан – Три (съответно на латиница: Alanine – Ala, Proline – Pro, Tryptophan – Trp).

Еднобуквените съкращения не могат да следват този принцип: само шест от първите букви на имената на аминокиселините не се повтарят (Cys, His, Ile, Met, Ser, Val). За означаване на останалите трябва да се търсят още латински букви. Маргарит Дейхоф прилага определени правила при определяне на еднобуквените съкращения.

Малките аминокиселини с проста структура и често срещани в белтъците (глицин, аланин, серин, треонин, пролин) се означават с първата си буква.

Глицин (Гли)	Glycine	Gly	G
Аланин (Ала)	Alanine	Ala	A
Серин (Сер)	Serine	Ser	S
Треонин (Тре)	Threonine	Thr	T
Пролин (Про)	Proline	Pro	P

Някои от тях (Гли, Ала, Про) са хидрофобни (неполярни) аминокиселини. Някои от другите хидрофобни аминокиселини също се обозначават с първата им буква, както и цистеина, който допълнително има способността да образува дисулфидни мостове.

Цистеин (Цис)	Cysteine	Cys	C
Метионин (Мет)	Methionine	Met	M
Валин (Вал)	Valine	Val	V
Левцин (Лев)	Leucine	Leu	L
Изолевцин (Иле)	Isoleucine	Ile	I

При аминокиселините с киселинен характер и амидите Дейхоф търси някаква буква, която може лесно да се запомни, защото я има в името или има фонетично, или графично подобие:

Аспартат (Асп)	Aspartate	Asp	N	DasparDate
Аспарагин (Асн)	Asparagine	Asn	N	asparagiNe
Глутамат (Глу)	Glutamate	Glu	E	gluEtamate
Глутамин (Глн)	Glutamine	Gln	Q	<u>Q</u> /Glutamine

Същото е и с аминокиселините с основен характер:

Аргинин (Арг)	Arginine	Arg	R	aRginine
Хистидин (Хис)	Histidine	His	H	first letter
Лизин (Лиз)	Lysine	Lys	K	K is next to L

Дейхоф няма голям избор и при аминокиселините с ароматни групи:

Тирозин (Тир)	Tyrosine	Tyr	Y	tYrosine
Фенилаланин (Фен)	Phenylalanine	Phe	F	F (phonetics)
Триптофан (Три)	Tryptophan	Try	W	tWo rings

БЕЛЕЖКИ

1. CDC, 2021. Centers for Disease Control and Prevention. SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions, updated October 4, 2021. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/cases-updates/variant-surveillance/variant-info.html>
2. Corum, J. and Zimmer, C., 2020. Bad News Wrapped in Protein: Inside the Coronavirus Genome (April 3, 2020) The New York Times <https://www.nytimes.com/interactive/2020/04/03/science/coronavirus-genome-bad-news-wrapped-in-protein.html>
3. Corum, J. and Zimmer, C., 2021. Coronavirus Variants and Mutations (update June 4, 2021) The New York Times <https://www.nytimes.com/interactive/2021/health/coronavirus-variant-tracker.html>
4. ECDC, 2020. European Centre for Disease Prevention and Control. Detection of new SARS-CoV-2 variants related to mink - 12 November 2020. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/detection-new-sars-cov-2-variants-mink>
5. Edwards, A., 2021. Merck v Pfizer: here's how the two new COVID antiviral drugs work and will be used. The Conversation, 12 November 2021 <https://theconversation.com/merck-v-pfizer-heres-how-the-two-new-covid-antiviral-drugs-work-and-will-be-used-171247>
6. Global Virus Network. COVID-19 variants: alpha, beta, gamma, delta. Vaccines. <https://gvn.org/#>
7. Oxfam, 2021. Two-thirds of epidemiologists warn mutations could render current COVID vaccines ineffective in a year or less (31 March) <https://www.oxfam.org/en/press-releases/two-thirds-epidemiologists-warn-mutations-could-render-current-covid-vaccines>

8. WHO, 2020. World Health Organization. Therapeutics and COVID-19: living guideline. Conditional recommendation against remdesivir in hospitalized patients with COVID-19 (published 20 November 2020) <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-therapeutics-2021.3>
9. WHO, 2021. World Health Organization. Naming SARS-CoV-2 variants. 31 May 2021. <https://www.who.int/news/item/31-05-2021-who-announces-simple-easy-to-say-labels-for-sars-cov-2-variants-of-interest-and-concern>
10. NCIPD, 2021. (НЦЗПБ – Национален център по заразни и паразитни болести, Справки за секвенирани варианти на SARS-COV-2 в България. https://www.ncipd.org/index.php?option=com_k2&view=item&id=546:ncov-012020&lang=bg

REFERENCES

- Almeida, J. D. et al., 1968. Virology: Coronaviruses. *Nature*, **220**, 650.
- Baltimore, D., 1971. Expression of animal virus genomes. *Bacteriological reviews*, **35**, 235 – 241.
- Bar-On, Y.M. et al., 2020. Science Forum: SARS-CoV-2 (COVID-19) by the numbers. *Elife*, **9**, e57309. <https://DOI:10.7554/eLife.57309>
- Cui, J., Li, F. and Shi, Z.L., 2019. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, **17**(3), 181 – 192.
- Dolgin, E., 2021. How protein-based COVID vaccines could change the pandemic. *Nature*, **599**, 359 – 360.
- Duffy, S., 2018. Why are RNA virus mutation rates so damn high?. *PLoS biology*, **16**(8), e3000003. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000003>
- Fehr, A.R. and Perlman, S., 2015. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Coronaviruses*, 1 – 23.
- Focosi, D. and Maggi, F., 2021. Neutralising antibody escape of SARS-CoV-2 spike protein: Risk assessment for antibody-based COVID-19 therapeutics and vaccines. *Reviews in Medical Virology*. [16 March 2021] <https://doi.org/10.1002/rmv.2231>
- Hadjiolov, A., P. Venkov and L. Karagyozev, 1976. *Structure and function of genes*. Sofia: Nauka i izkustvo
- Hall, V.J. et al., 2021. SARS-CoV-2 infection rates of antibody-positive compared with antibody-negative health-care workers in England: a large, multicentre, prospective cohort study (SIREN). *The Lancet*, **397**(10283), 1421 – 1423.
- Huang, Y. et al., 2020. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacologica Sinica*, **41**(9), 1141 – 1149.
- Krammer, F., 2021. Correlates of protection from SARS-CoV-2 infection. *The Lancet*, **397**(10283), 1421 – 1423.

- Mascola, J.R., Graham, B.S. and Fauci, A.S., 2021. SARS-CoV-2 viral variants—tackling a moving target. *Jama*, **325**(13), 1261 – 1262.
- Mole, B., 2021. Meet molnupiravir, Merck’s Thor-inspired pill that hammers COVID. *Ars Technica* [1 october 2021] <https://arstechnica.com/science/2021/10/meet-molnupiravir-mercks-thor-inspired-pill-that-hammers-covid/>
- Perlman, S., 2020. Another decade, another coronavirus. *N Engl J Med*, **382**, 760 - 762. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMe2001126>
- Pilz, S. et al., 2021. SARS-CoV-2 reinfection risk in Austria. *European Journal of Clinical Investigation*, **51**(4), e13520. <https://doi.org/10.1111/eci.13520>
- Rambaut, A. et al., 2020. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nature microbiology*, **5**(11), 1403 – 1407.
- Sabino, E.C. et al., 2021. Resurgence of COVID-19 in Manaus, Brazil, despite high seroprevalence. *The Lancet*, **397**(10273), 452 – 455.
- Wise, J., 2020. Covid-19: New coronavirus variant is identified in UK. *BMJ* [Internet]. 2020 Dec 16 [cited 2020 Dec 23]; 371: m4857. <https://www.bmj.com/content/371/bmj.m4857.short>
- Wrapp, D. et al., 2020. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, **367**(6483), 1260 – 1263.
- Wu, F. et al., 2020. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, **579**(7798), 265 – 269.
- Zhukova, A. et al., 2020. Origin, evolution and global spread of SARS-CoV-2. *Comptes Rendus. Biologies*. [Nov. 24, 2020] <https://doi.org/10.5802/crbiol.29>
- Dayhoff, M.O. ed., 1969. *Atlas of protein sequence and structure* (Vol. 4). National Biomedical Research Foundation.
- Hadjiolov, A., P. Venkov and L. Karagyzov, 1976. *Structure and function of genes*. Sofia: Nauka i izkustvo
- Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature, 1983. <https://web.archive.org/web/20081019171450/http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/AminoAcid/index.html>
- The origin of the single-letter code for the amino acids http://www.biology.arizona.edu/biochemistry/problem_sets/aa/dayhoff.html

MUTATIONS AND VARIANTS OF SARS-COV-2, THE CORONAVIRUS CAUSING COVID-19

Abstract. In 2020, the SARS-CoV-2 coronavirus caused a pandemic with severe consequences for many countries. The life cycle of the virus is briefly described. It is noted that the multiplication of viral genetic material is accompanied by the emergence of mutations, which leads to the emergence of new viral variants. Viral variants may differ in their effectiveness in infecting, spreading, in the severity of the disease they cause, and in their ability to escape acquired immunity. The most important SARS-CoV-2 variants that have emerged so far are discussed. The need for global monitoring of the emergence of new variants and rapid and mass vaccination to tackle the pandemic is emphasized.

Keywords: coronaviruses; SARS-CoV-2 variants; variants of concern; emerging variants

✉ **Lachezar Karagyzov (corresponding author)**

ORCID iD: 0000-0003-1484-5402

Biological Faculty

Sofia University

Sofia 1164, Bulgaria

E-mail: lucho3k@gmail.com