

## НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-95>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



## Выявление SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) у детей с острой кишечной инфекцией в Нижнем Новгороде за период 2020–2021 гг.

Морозова О.В., Новикова Н.А., Епифанова Н.В., Новиков Д.В., **Мохонов В.В.**, Сашина Т.А., Зайцева Н.Н.

ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 603950, Нижний Новгород, Россия

**Введение.** Новая коронавирусная инфекция COVID-19 является серьезной проблемой общественного здравоохранения во всем мире. В ряде публикаций показано наличие при этом заболевании помимо респираторных нарушений симптомов со стороны желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) (тошноты, рвоты, диареи).

**Цель** настоящей работы – мониторинг РНК возбудителя COVID-19 – коронавируса SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) у детей, госпитализированных с острой кишечной инфекцией (ОКИ), с последующей молекулярно-генетической характеристикой обнаруженных штаммов.

**Материал и методы.** Материалом для исследования служили образцы фекалий детей с ОКИ, находившихся на госпитализации в инфекционном стационаре Нижнего Новгорода в период с 01.07.2020 по 31.10.2021 гг. Обнаружение вирусной РНК проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Определение нуклеотидной последовательности фрагмента гена S-белка осуществляли методом секвенирования по Сэнгеру.

**Результаты и обсуждение.** При исследовании 2476 образцов фекалий детей с ОКИ, генетический материал SARS-CoV-2 выявлен в 45 образцах. Максимальное количество проб, содержащих РНК вируса SARS-CoV-2, приходилось на ноябрь 2020 г. (частота обнаружения 12,2%). В 20,0% случаев вирусная РНК детектирована в сочетании с рота-, норо- и аденовирусами. Установлены 28 нуклеотидных последовательностей комплементарной ДНК (кДНК) фрагмента гена S-белка. Филогенетический анализ показал принадлежность изучаемых штаммов SARS-CoV-2 к 2 вариантам. При анализе аминокислотной последовательности S-белка у исследованных штаммов показано отсутствие в выборке 2020 г. мутации N501Y, являющейся маркером вариантов с высоким эпидемическим потенциалом (ВЭП) – вызывающих озабоченность (*англ.* variants of concern, VOC) согласно определению Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) (линии Alpha B.1.1.7, Beta B.1.351, Gamma P.1). В 2 образцах, изолированных в сентябре 2021 г., идентифицирован вариант линии B.1.617.2 Delta.

**Заключение.** Обнаружение РНК SARS-CoV-2 в копроматериале детей с ОКИ, свидетельствующее о возможности реализации фекально-орального механизма передачи возбудителя, определяет необходимость оптимизации его мониторинга и разработки алгоритма работы с пациентами, имеющими признаки ОКИ, в условиях пандемии новой коронавирусной инфекции.

**Ключевые слова:** SARS-CoV-2, острая кишечная инфекция (ОКИ), дети до 14 лет

**Для цитирования:** Морозова О.В., Новикова Н.А., Епифанова Н.В., Новиков Д.В., **Мохонов В.В.**, Сашина Т.А., Зайцева Н.Н. Выявление SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) у детей с острой кишечной инфекцией в Нижнем Новгороде за период 2020–2021 гг. *Вопросы вирусологии.* 2022; 67(1): 69-76. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-95>

**Для корреспонденции:** Морозова Ольга Владимировна, канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций, ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) (ННИИЭМ Роспотребнадзора), 603950, Нижний Новгород, Россия. E-mail: [olga.morozova.bsc@gmail.com](mailto:olga.morozova.bsc@gmail.com)

**Участие авторов:** Морозова О.В. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментальных исследований, анализ литературных данных, оформление результатов, написание текста статьи; Новикова Н.А. – организация и руководство исследованием, написание текста статьи; Епифанова Н.В. – написание текста статьи, статистическая обработка результатов; Новиков Д.В. – проведение экспериментальных исследований; **Мохонов В.В.** – проведение экспериментальных исследований; Сашина Т.А. – проведение экспериментальных исследований; Зайцева Н.Н. – общее руководство, одобрение окончательного варианта статьи для публикации.

**Финансирование.** Исследование проведено в рамках выполнения Государственного задания Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) № 141-00105-21-00 от 14.01.2021.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Этическое утверждение.** Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен локальным Этическим комитетом ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) (ННИИЭМ Роспотребнадзора) (Протокол № 12 от 10.12.2021).

Поступила 30.11.2021

Принята в печать 14.01.2022

Опубликована 28.02.2022

## ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-95>

## Detection SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) in children with acute intestinal infection in Nizhny Novgorod during 2020–2021

Olga V. Morozova, Nadezhda A. Novikova, Natalia V. Epifanova, Dmitry V. Novikov, Vladislav V. Mokhonov, Tatiana A. Sashina, Natalia N. Zaytseva

FSBI «Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology» of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), 603950, Nizhny Novgorod, Russia

**Introduction.** The novel coronavirus infection COVID-19 is a major public health problem worldwide. Several publications show the presence of gastrointestinal (GI) symptoms (nausea, vomiting, and diarrhea) in addition to respiratory disorders.

The **aim** of this study was the monitoring of RNA of COVID-19 pathogen, coronavirus SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus*) in children hospitalized with acute intestinal infection (All), with following molecular-genetic characterization of detected strains.

**Material and methods.** Fecal samples of children with All hospitalized in infectious hospital of Nizhny Novgorod (Russia) in the period from 01.07.2020 to 31.10.2021 were used as material for the study. Viral RNA detection was performed by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). The nucleotide sequence of S-protein gene fragment was determined by Sanger sequencing.

**Results and discussion.** SARS-CoV-2 genetic material was detected in 45 out of 2476 fecal samples. The maximum number of samples containing RNA of the virus occurred in November 2020 (detection rate of 12.2%). In 20.0% of cases, SARS-CoV-2 RNA was detected in combination with rota-, noro-, and adenoviruses. 28 nucleotide sequences of S-protein gene fragment complementary DNA (cDNA) were determined. Phylogenetic analysis showed that the studied SARS-CoV-2 strains belonged to two variants. Analysis of the S-protein amino acid sequence of the strains studied showed the absence of the N501Y mutation in the 2020 samples, which is a marker for variants with a high epidemic potential, called variants of concern (VOC) according to the World Health Organization (WHO) definition (lines Alpha B.1.1.7, Beta B.1.351, Gamma P.1). Delta line variant B.1.617.2 was identified in two samples isolated in September 2021.

**Conclusion.** The detection of SARS-CoV-2 RNA in the fecal samples of children with All, suggesting that the fecal-oral mechanism of pathogen transmission may exist, determines the necessity to optimize its monitoring and to develop an algorithm of actions with patients with signs of All under the conditions of a novel coronavirus infection pandemic.

**Keywords:** SARS-CoV-2, acute intestinal infection (All), children under the age of 14

**For citation:** Morozova O.V., Novikova N.A., Epifanova N.V., Novikov D.V., Mokhonov V.V., Sashina T.A., Zaytseva N.N. Detection SARS-COV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) in children with acute intestinal infection (Nizhny Novgorod region, 2020-2021). *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(1): 69-76 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-95>

**For correspondence:** Olga V. Morozova, Ph.D., Researcher of the Molecular Epidemiology of Viral Infections Laboratory, FSBI «Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology» of the Federal Service for Supervision of Consumer Right Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), 603950, Nizhny Novgorod, Russia. E-mail: [olga.morozova.bsc@gmail.com](mailto:olga.morozova.bsc@gmail.com)

**Information about the authors:**

Morozova O.V., <https://orcid.org/0000-0002-8058-8187>

Novikova N.A., <https://orcid.org/0000-0002-3710-6648>

Epifanova N.V., <https://orcid.org/0000-0001-7679-8029>

Novikov D.V., <https://orcid.org/0000-0001-7049-6935>

Mokhonov V.V., <https://orcid.org/0000-0002-8542-5723>

Sashina T.A., <https://orcid.org/0000-0003-3203-7863>

Zaytseva N.N., <https://orcid.org/0000-0001-5370-4026>

**Contribution:** Morozova O.V. – concept and design of the study, research conducting, analysis of literature data, presentation of results, writing the text of the article; Novikova N.A. – organization and management of research, writing the text of the article; Epifanova N.V. – writing the text of the article, statistical processing of the results; Novikov D.V. – research conducting; Mokhonov V.V. – research conducting; Sashina T.A. – research conducting; Zaitseva N.N. – general guidance, final approval of the final version of the article for publication.

**Funding.** The study was funded by the Federal Service for Supervision of Consumer Right Protection and Human Welfare (Rospotrebnadzor) as a part of the federal program No 141-00105-21-00 dated January 14, 2021.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Ethics approval.** The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Local Ethics Committee of the «Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology» (Protocol No. 12 dated December 21, 2021).

Received 30 November 2021

Accepted 14 January 2022

Published 28 February 2022

## Введение

Вирус SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) является возбудителем новой коронавирусной инфекции (COVID-19), впервые зарегистрированной в г. Ухань (Китайская Народная Республика (КНР) в декабре 2019 г. [1, 2]. Коронавирусы являются причиной респираторных и кишечных инфекционных заболеваний как у людей, так и у животных [3]. COVID-19 чаще всего проявляется респираторными нарушениями [4]; в то же время в ряде случаев могут присутствовать симптомы со стороны желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), признаки поражения нервной, сердечно-сосудистой систем и другие осложнения. Помимо лёгочной ткани генетический материал SARS-CoV-2 обнаружен в почках, сердце, печени, мозге инфицированных пациентов [5].

Геном возбудителя представлен однонитевой РНК положительной полярности. Вирус проникает в клетки через рецептор – ангиотензинпревращающий фермент 2 (АПФ2) (angiotensin converting enzyme 2, ACE2) [6]. Продемонстрирована его экспрессия в эпителиоцитах пищевода, энтероцитах подвздошной и толстой кишки, что позволяет предположить возможность репродукции патогена в этих клетках [7–10]. Показано, что до 79% больных с COVID-19 в Ухане имели такие симптомы поражения ЖКТ, как диарея, снижение аппетита, тошнота, рвота, боли в животе и желудочно-кишечное кровотечение [11]. У ряда пациентов (взрослых и детей) с последующим лабораторным подтверждением инфицирования SARS-CoV-2 наблюдали только диарею и рвоту при отсутствии катаральных явлений и гипертермии [12–14]. Ряд исследований продемонстрировал присутствие вируса в образцах стула, перенесших новую коронавирусную инфекцию как с диареей, так и без неё [9, 15].

Обнаружение SARS-CoV-2 в образцах кала служит доказательством его тропизма к эпителию ЖКТ [2, 16]. Сравнение результатов анализа копрома- териала пациентов с клиническими проявлениями COVID-19 разной степени выраженности позволило предположить, что наличие РНК возбудителя в фекалиях не связано с тяжестью заболевания и/или проявлением гастроинтестинальных симптомов. Возраст выделявших вирус с фекалиями варьировал от 10 мес. до 78 лет, а результаты сохранялись позитивными на

протяжении до 16 сут [17, 18]. РНК нового коронавируса выявляли в образцах кала спустя 2–5 сут после верификации положительных результатов исследования респираторных мазков и в ряде случаев – после получения отрицательного результата [15–17]. По мнению F. Xiao и соавт., наличие вирионов SARS-CoV-2 в копрома- териале пациентов с COVID-19 доказывает существование алиментарного пути передачи этого вируса [19].

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) совместно с партнёрами, экспертными сетями, национальными органами и исследовательским сообществом осуществляет мониторинг возникающих вариантов SARS-CoV-2. На территории Российской Федерации по состоянию на сентябрь 2021 г. высоким эпидемическим потенциалом (ВЭП) обладают вызывающие озабоченность (*англ.* variants of concern, VOC) согласно определению ВОЗ варианты вируса линий Alpha (Британский, B.1.1.7+Q.), Beta (ЮАР, B.1.351), Gamma (Бразильский, P.1) и Delta (Индийский-2, B.1.617.2 + AY.). В ноябре 2021 г. в Южной Африке впервые идентифицирован вариант SARS-CoV-2 линии B.1.1.529 Omicron. В декабре 2021 г. штамм Omicron выявлен на территории РФ, в т.ч. в Нижнем Новгороде. Кроме этого, ряд вариантов относится к требующим дополнительных исследований (ТДИ) [20].

В настоящее время в научной литературе отсутствуют данные о выявлении SARS-CoV-2 в копрома- териале детей с острой кишечной инфекцией (ОКИ) без диагноза COVID-19. В нашей работе проведено исследование по определению генетического материала этого вируса в образцах стула пациентов детского возраста, госпитализированных с ОКИ в инфекционный стационар Нижнего Новгорода в 2020–2021 гг., а также дана молекулярно-биологическая характеристика обнаруженных штаммов.

## Материал и методы

*Нативные образцы.* Выполнено продольное эпидемиологическое исследование по определению РНК SARS-CoV-2 в 2476 образцах копрома- териала детей в возрасте от 1 мес. до 17 лет, госпитализированных в инфекционный стационар Нижнего Новгорода с картиной ОКИ без респираторных симптомов в период с 01.07.2020 по 31.10.2021 г. На момент поступления обследование на присутствие SARS-CoV-2 не проводили. В работе



использовали остаточное количество образцов фекалий, взятых во время стандартной клинической практики, связанной с проведением диагностики на наличие вирусов кишечной группы: ротавирусов (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus A*); норовирусов (*Caliciviridae: Norovirus*); аденовирусов (*Adenoviridae: Mastadenoviridae: Human adenovirus*); астровирусов (*Astroviridae: Mastastrovirus*), а также энтеровирусов (*Picornaviridae: Enterovirus*). Исследование проводили в формате случайной выборки и анонимного тестирования.

У всех участников или лиц, представляющих несовершеннолетних пациентов, получено добровольное информированное согласие. Протокол исследования одобрен локальным Этическим комитетом ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) (ННИИЭМ Роспотребнадзора).

Выделение тотальной РНК из клинического материала проводили с использованием комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК «РИБО-преп» (ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора)) согласно инструкции по применению. Детекцию вирусов кишечной группы выполняли при помощи тест-систем: «АмплиСенс Rotavirus/Norovirus/Astrovirus-FL», «АмплиСенс ОКИ скрин-FL», «АмплиСенс Enterovirus-FL» (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора).

**Выявление РНК SARS-CoV-2** осуществляли посредством полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с помощью набора реагентов «Вектор-ПЦР-2019-nCoV-RG» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), на приборе CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) также в соответствии с инструкцией производителя.

**Секвенирование по Сэнгеру.** На основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генома SARS-CoV-2, представленных в GenBank, были подобраны праймеры для амплификации фрагмента комплементарной ДНК (кДНК) размером 789 п.н., кодирующего домен связывания белка S вируса с рецептором АПФ2:

– праймер SF: 5'-TGT GCA CTT GAC CCT CTC TCA GAA ACA AAG TGT AC-3';

– праймер SR: 5'-AGT AAG AAC ACC TGT GCC TGT TAA ACC ATT GAA G-3'.

Последовательности полученных фрагментов кДНК устанавливали с использованием генетического анализатора Beckman Coulter GenomeLab GeXP и набора реагентов DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter, США) согласно рекомендациям производителя.

**Филогенетический анализ.** Для филогенетического анализа была сформирована выборка нуклеотидных последовательностей, включающая:

– полученные в данном исследовании и депонированные в GenBank (№№ OL444789–OL444815 ( $n = 28$ );

– близкородственные геномные последовательности изолированных на территориях других стран вариантов SARS-CoV-2, зарегистрированные в базах данных GenBank и GISAID ( $n = 50$ );

– полногеномные последовательности принадлежащих к разным линиям штаммов, изолированных на территории Нижнего Новгорода из респираторных мазков, доступные в базе данных GISAID ( $n = 25$ );

последовательности вариантов с ВЭП (VOC) линий B.1.1.7, B.1.135, P.1 ( $n = 13$ );

последовательность референсного генома коронавируса, идентифицированного в Ухане ( $n = 1$ ).

Подбор модели эволюции и филогенетический анализ осуществляли в программе MEGA X [21]. Филогенетическое дерево конструировали методом максимального правдоподобия (maximum likelihood) с использованием трёхпараметрической модели эволюции Тамуры T92 (Tamura 3-parameter).

**Статистическую обработку полученных данных** проводили с использованием критерия  $\chi^2$ . Различия определяли как достоверные при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты

При ретроспективном анализе 2476 образцов фекалий детей, госпитализированных в инфекционный стационар с ОКИ, генетический материал SARS-CoV-2 выявлен в 45 пробах. Частота обнаружения составила за 2020 г. 4,3% (34 пробы из 798), в 2021 г. – 0,7% (11/1678). При постановке ПЦР-РВ с использованием сертифицированной тест-системы во всех случаях детекции РНК вируса значение порогового цикла (cycle threshold, Ct) оказалось высоким – от 24,95 до 39,19. В 12 образцах величина Ct превышала значение диагностического порогового цикла, указанное в инструкции к набору ( $>35$ ). Однако присутствие РНК SARS-CoV-2 в пробах, которые при скрининге формально имели статус отрицательных, подтверждено при амплификации и секвенировании фрагмента вирусного генома с использованием праймеров, подобранных в ходе данной работы.

Все исследованные образцы предварительно были протестированы на вирусы кишечной группы (рота-, норо-, адено-, астровирусы) и энтеровирусы, что позволило проанализировать наличие микст-инфекций. В 5 образцах РНК SARS-CoV-2 обнаружена в сочетании с РНК норовируса, в 1 пробе с РНК ротавируса и в ещё 1 случае – с ДНК аденовируса. В 2 образцах коронавирусы идентифицированы в комбинации с рота-/норо- и норо-/аденовирусами. Энтеровирусы в SARS-CoV-2-содержащих образцах не обнаружены. Таким образом, в 80% случаев SARS-CoV-2 в образцах стула детей с диареей выявлен в виде возбудителя моновирусной инфекции.

Относительно возрастных групп вирусная РНК идентифицирована в следующих соотношениях: от 0 до 12 мес. – 27,3%  $\pm$  1,2; от 1 до 2 лет – 24,2%  $\pm$  1,1; от 3 до 7 лет – 39,4%  $\pm$  1,3; старше 7 лет – 9,1%  $\pm$  0,7.

Кроме того, проведён анализ помесечного распределения положительных образцов (**рис. 1**). Число проб,

содержащих РНК SARS-CoV-2, увеличивалось с июля по декабрь 2020 года. Пик обнаружения пришёлся на ноябрь 2020 г. – 12,2 % (19/156). В период с января по июль 2021 г. вирусный генетический материал в фекалиях госпитализированных с ОКИ детей не выявлен. В то же время с июля по октябрь 2021 г. РНК коронавируса детектирована в 11 пробах из 1678 исследованных (0,7%), что статистически значимо ниже ( $\chi^2 = 39,39; p < 0,001$ ), чем в 2020 г. Таким образом, РНК SARS-CoV-2 обнаруживали в период начала сезонного подъёма заболеваемости ОКИ вирусной этиологии, в частности рота- и норовирусной инфекций (рис. 1).

В 31 случае установлена нуклеотидная последовательность фрагмента генома SARS-CoV-2, что подтвердило наличие его РНК в образцах; из них 28 последовательностей использованы для филогенетического анализа. Ввиду ненадлежащего качества 3 последовательности были исключены из дальнейшей работы. Филогенетический анализ показал, что штаммы SARS-CoV-2, обнаруженные у детей с ОКИ в Нижнем Новгороде в 2020 г., ведут своё происхождение от референсного штамма, изолированного на территории г. Ухань в 2019 г., – hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019 (EPI\_ISL\_402124). Гомология нуклеотидных последовательностей составила 99,3–100,0%. Как видно на рисунке 2, а, выявленные штаммы кластеризуются отдельно от представителей линий Alpha, Beta и Gamma. Из выборки 2021 г. для филогенетического анализа использованы 3 нуклеотидные последовательности. При этом 1 штамм SARS-CoV-2, изолированный в августе 2021 г., кластеризовался с большинством нижегородских штаммов, детектированных в 2020 г.; 2 других, выделенные в сентябре того же года, принадлежали линии Delta.

Уровень различий нуклеотидных последовательностей вирусных штаммов, изолированных в Нижнем Новгороде, и вариантов с ВЭП варьировал от 0,4 до 0,8%. Близкородственные выявленным штаммам

SARS-CoV-2 вирусы идентифицированы на территории Соединённых Штатов Америки (США), Италии, Японии, Великобритании и других стран, в т.ч. у домашних животных (кошек (*Felis catus*) и собак (*Canis familiaris*)), живущих с инфицированными новым коронавирусом людьми. В базе данных GISAID представлено 25 полных последовательностей генома SARS-CoV-2, изолированного из назофарингеальных мазков от больных COVID-19 в Нижнем Новгороде за период с июня 2020 по сентябрь 2021 г. Часть этих последовательностей кластеризовалась вместе с полученными в данном исследовании штаммами.

При анализе аминокислотных последовательностей домена связывания S-белка коронавируса с рецептором установлено, что в позиции 501 у всех секвенированных штаммов находится аспарагин (Asn, N) и отсутствует замена N501Y, характерная для генотипов с ВЭП Alpha, Beta и Gamma. Нуклеотидные последовательности 2 штаммов, выявленных в сентябре 2021 года, несли мутации L452R и T478K, что позволяет отнести их к линии B.1.617.2. В исследованной выборке установлено присутствие единичных мутаций в позициях N437S, Q474R и S477T. Последовательность геномного фрагмента штамма SARS-CoV-2, изолированного в августе 2021 г. (период абсолютного превалирования Delta-варианта), не содержала мутаций L452R и T478K, являющихся маркерными для линии Delta (рис. 2, б).

### Обсуждение

В настоящее время известно 7 видов коронавирусов, поражающих человека. Из них 4 вызывают лёгкие респираторные симптомы: 229E, NL63 (род *Alphacoronavirus*), OC43, HKU1 (род *Betacoronavirus*). Эти инфекционные агенты выделены как из назофарингеальных мазков, так и из образцов стула детей с ОКИ [22, 23]. При этом частота выявления каждого серотипа коронавируса и выраженность проявления

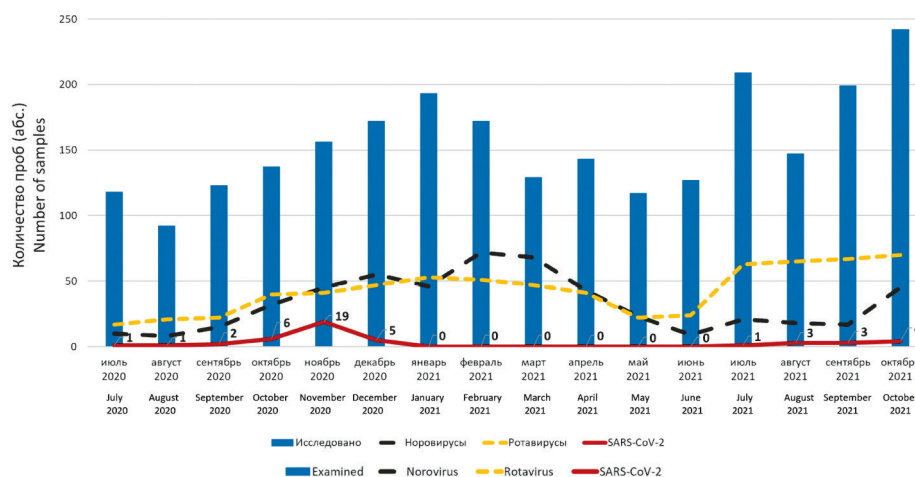
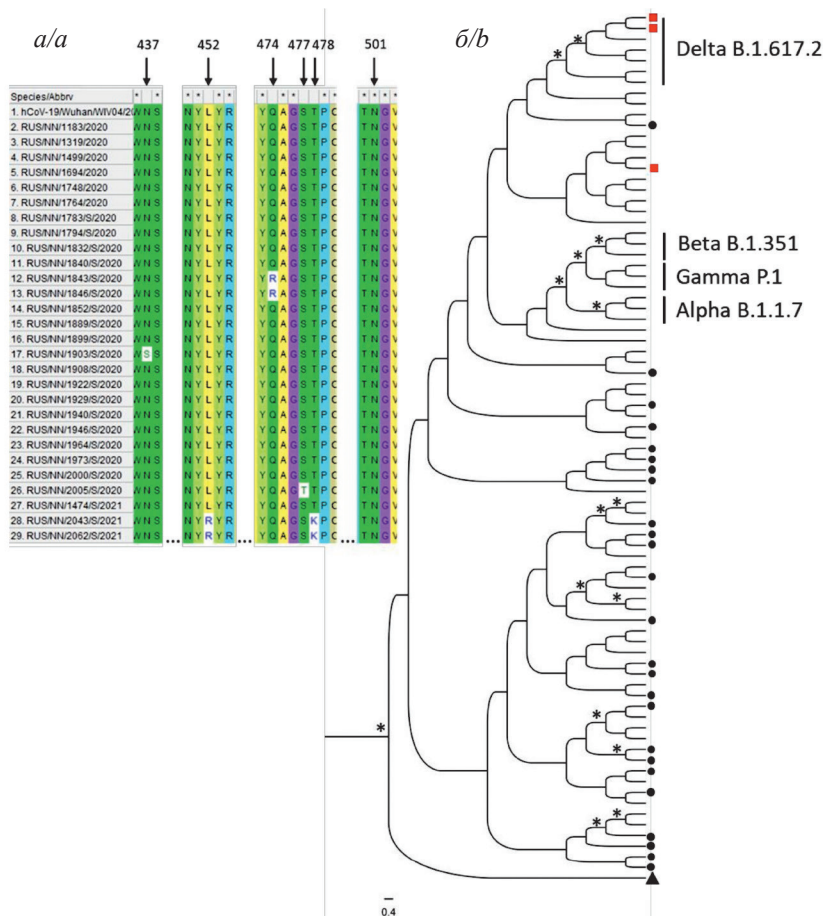


Рис. 1. Помесячное обнаружение РНК SARS-CoV-2 в образцах копроматериала детей с острой кишечной инфекцией.  
Fig. 1. Monthly detection of SARS-CoV-2 RNA in fecal samples from children with an acute intestinal infection.



**Рис. 2.** Молекулярно-генетическая характеристика SARS-CoV-2 изолированного у детей с ОКИ.

a) – аминокислотные последовательности фрагмента S-белка SARS-CoV-2, обнаруженного у детей с острой кишечной инфекцией; замены выделены белым цветом; б) – филогенетическое дерево, сконструированное на основе частичных нуклеотидных последовательностей гена S-белка штаммов SARS-CoV-2, обнаруженных у детей с острой кишечной инфекцией в Нижнем Новгороде, и близкородственных последовательностей, доступных в базах данных GISAID и GenBank;

**Примечание.** ● – штаммы, изолированные в 2020 г., ■ – штаммы, изолированные в 2021 г., ▲ – референсный штамм, изолированный в г. Ухань в 2019 г.

**Fig. 2.** Molecular and genetic characteristics of SARS-CoV-2 isolated from children with acute intestinal infections.

a), amino acid sequences of the SARS-CoV-2 S-protein fragment found in children with an acute intestinal infection, amino acid substitutions are highlighted in white; b), phylogenetic tree constructed on the basis of partial nucleotide sequences of the S-protein gene of SARS-CoV-2 strains found in children with acute intestinal infection in Nizhny Novgorod, and closely related sequences available in the GISAID and GenBank databases.

**Note.** ●, strains isolated in 2020; ■, strains isolated in 2021; ▲, reference strain isolated in Wuhan in 2019.

симптомов поражения ЖКТ варьировала в зависимости от возраста заболевших и региона их проживания [24]. Другие 3 вида – MERS-CoV (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Merbecovirus*), SARS-CoV и SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) – могут вызывать тяжёлую симптоматическую инфекцию с коэффициентом летальности 15,0, 37,0 и 0,4–2,3% (до 15,4% в некоторых странах) соответственно [25, 26].

Ранее исследователями из разных стран установлено, что MERS-CoV, способный вызывать у человека заболевание с тяжёлым респираторным синдромом, мог устойчиво поддерживать собственную репликацию в клетках тонкой кишки [27]. При инфицировании SARS-CoV помимо респираторных расстройств и гипертермии распространённым клиническим проявлением заболевания является диарея. По данным

ряда авторов, от 20,3 до 73,0% пациентов при заражении имели кишечные симптомы [28–31]. Более того, в некоторых случаях вирус обнаруживали в фекалиях спустя 10 нед после начала инфекции [3]. Показано, что ЖКТ может быть мишенью для SARS-CoV, а выделяемый с калом вирус способен распространяться, инфицируя других лиц [32].

В нашей работе РНК SARS-CoV-2 обнаружена в копроматериале детей, госпитализированных с картиной ОКИ без симптомов острой респираторной вирусной инфекции (ОРВИ) и диагноза COVID-19. Генетический материал вируса выявлен у детей дошкольного возраста во всех возрастных группах с одинаковой частотой. ПЦР-тестирование характеризовалось высокими значениями Ct, однако наличие РНК в пробах подтверждалось амплификацией фрагментов и их секвенированием с использованием ори-



гинальных праймеров. Высокий показатель  $C_t$  мог свидетельствовать о низкой концентрации вирусных частиц в субстрате, что, вероятно, связано со слабой репликативной активностью SARS-CoV-2 в клетках слизистой оболочки ЖКТ. В пользу этого говорит отсутствие у госпитализированных с ОКИ детей, выделявших патоген с фекалиями, респираторных симптомов, при наличии которых возбудитель мог бы попасть в ЖКТ с секретами дыхательных путей.

В ходе исследования установлено статистически достоверное различие частоты выявления РНК нового коронавируса в копро материале детей в 2020 г. – 4,3% и в 2021 г. – 0,7% ( $p < 0,001$ ). Наибольшее количество позитивных проб пришлось на ноябрь 2020 г., когда частота обнаружения составила 12,2%, снизившись в декабре до 2,9%. В последующие месяцы (с января по июнь 2021 г.) образцов, содержащих РНК SARS-CoV-2, не выявлено. Следует отметить, что согласно данным официальной статистики в указанный период времени в Нижнем Новгороде наблюдался рост заболеваемости COVID-19: регистрировалось 394–458 случаев заражения вариантом Wuhan в сутки, в основном взрослого населения. В июле–октябре 2021 г. в образцах фекалий госпитализированных с ОКИ детей отмечено 11 положительных находок РНК SARS-CoV-2. В это время с конца июня 2021 г. отмечен рост заболеваемости COVID-19 (473–503 заражения за сутки), вызванной индийским (Delta) вариантом. Снижение частоты обнаружения SARS-CoV у детей, госпитализированных с явлениями ОКИ в сезон 2021 г., может быть связано с распространением в популяции нового варианта вируса Delta.

В 80,0% случаев SARS-CoV-2 обнаружен в виде патологического агента моновирусной инфекции при отсутствии рота-, норо-, адено-, астровирусов, которые являются ведущими возбудителями ОКИ, а также энтеровирусов, способных бессимптомно инфицировать детей или вызывать симптоматическую ОКИ. К настоящему времени накоплено достаточно свидетельств того, что в ряде случаев при COVID-19 возникают различные гастроинтестинальные симптомы (тошнота, рвота, диарея и др.) [33]. Клинические исследования, проведенные F. D'Amico и соавт. показывают, что частота возникновения диареи у инфицированных SARS-CoV-2, колеблется от 2,0 до 50,0% [34]. Она может предшествовать появлению респираторных проявлений либо сопровождать их. Объединенный анализ показал, что общая частота возникновения диареи составляет 10,4%. Кроме того, по некоторым данным, вирусная РНК в фекалиях обнаруживается на протяжении более длительного периода времени, чем в мазках из носоглотки [34].

Способность SARS-CoV-2 инфицировать эпителиоциты ЖКТ показана с использованием иммунофлуоресцентных методов. Получены данные, свидетельствующие, что белок ACE2, который, как доказано ранее, является клеточным рецептором для SARS-CoV-2, экспрессируется в железистых клетках эпителия желудка, двенадцатиперстной, тонкой киш-

ки и прямой кишки [7-10, 34]. В связи с этим можно предположить, что в настоящем исследовании при моноинфекции SARS-CoV-2 последний явился причиной симптомов поражения ЖКТ.

Обнаружение SARS-CoV-2 у госпитализированных с картиной ОКИ детей без респираторных симптомов и установленной COVID-19 ставит вопрос о необходимости тестирования на РНК нового коронавируса пациентов детского возраста, поступающих на стационарное лечение с этим диагнозом.

Выявленные штаммы SARS-CoV-2 были использованы для изучения их молекулярно-генетических особенностей. Все идентифицированные нами в 2020 и 2021 гг. штаммы проявили филогенетическое родство с референсным «уханьским» вариантом линии В, в частности Delta-вариантом (B.1.617.2).

К настоящему времени в результате анализа аминокислотной последовательности S-протеина SARS-CoV-2, выполняющего роль прикрепительного белка, обнаружены мутационные изменения, способные привести к изменению трансмиссивных свойств и тяжести течения заболевания [35]. Такой анализ показал особенности появившихся после «уханьского» варианта штаммов, имеющих мутации N501Y (линии Alpha, Beta, Gamma) и L452R, T478K (линия Delta) в S-белке, относительно референс-штамма. Выявленные нами в сентябре 2021 г. 2 образца несли мутации L452R и T478K, позволяющие отнести их к линии B.1.617.2 (Delta). Примечательно, что эти мутации отсутствовали в штамме коронавируса, который был изолирован в августе 2021 г. на фоне доминирования Delta-варианта на территории Нижнего Новгорода.

Появление в нижегородской популяции SARS-CoV-2 нового штамма линии B.1.1.529 Omicron требует проведения дальнейших исследований по выявлению данного штамма у детей, госпитализированных с картиной ОКИ.

### Заключение

В образцах стула детей, госпитализированных с ОКИ без диагноза COVID-19, в 45 случаях ( $n = 2476$ ) обнаружена РНК SARS-CoV-2, при этом последний выступил в качестве этиологического агента моновирусной инфекции в 80,0% случаев. Частота обнаружения вируса на протяжении 2020 г. составила 4,3% ( $n = 798$ ), в 2021 г. – 0,7% ( $n = 1678$ ) ( $p < 0,001$ ). Штаммы, изолированные в 2020 г., не несли маркерных мутаций для вариантов Alpha, Beta, Gamma и Delta, в то время как 2 из 3 секвенированных штаммов, выделенных в 2021 г., несли мутации L452R и T478K, характерные для варианта Delta B.1.617.2. Обнаружение РНК SARS-CoV-2 в копро материале детей с ОКИ, свидетельствующее о возможности реализации фекально-орального механизма передачи вируса, определяет необходимость оптимизации его мониторинга и разработки алгоритма работы с пациентами с данной нозологической формой в условиях пандемии новой коронавирусной инфекции.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Xiang Y.T., Yang Y., Li W., Zhang L., Zhang Q., Cheung T., et al. Timely mental health care for the 2019 novel coronavirus outbreak is urgently needed. *Lancet Psychiatry*. 2020; 7(3): 228–9. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(20\)30046-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(20)30046-8)
2. Holshue M.L., DeBolt C., Lindquist S., Lofy K.H., Wiesman J., Bruce H., et al. First case of 2019 novel coronavirus in the United States. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(10): 929–36. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001191>
3. Leung W.K., To K.F., Chan P.K., Chan H.L.Y., Wu A.K.L., Lee N., et al. Enteric involvement of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection. *Gastroenterology*. 2003; 125(4): 1011–7. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)01215-0](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)01215-0)
4. Wang X.W., Li J.S., Guo T.K., Zhen B., Kong Q.X., Yi B., et al. Concentration and detection of SARS coronavirus in sewage from Xiao Tang Shan Hospital and the 309<sup>th</sup> Hospital. *J. Virol. Methods*. 2005; 128(1-2): 156–61. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.03.022>
5. Puelles V.G., Lütgehetmann M., Lindenmeyer M.T., Spherhake J.P., Wong M.N., Allweiss L., et al. Multiorgan and renal tropism of SARS-CoV-2. *N. Engl. J. Med.* 2020; 383(6): 590–2. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2011400>
6. Wu F., Zhao S., Yu B., Chen Y.M., Wang W., Song Z.G., et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020; 579(7798): 265–9. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
7. Burgueño J.F., Reich A., Hazime H., Quintero M.A., Fernandez I., Fritsch J., et al. Expression of SARS-CoV-2 entry molecules ACE2 and TMPRSS2 in the gut of patients with IBD. *Inflamm. Bowel. Dis.* 2020; 26(6): 797e808. <https://doi.org/10.1093/ibd/izaa085>
8. Harmer D., Gilbert M., Borman R., Clark K.L. Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. *FEBS Lett.* 2002; 532(1-2): 107–10. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03640-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03640-2)
9. Xiao F., Tang M., Zheng X., Liu Y., Li X., Shan H. Evidence for gastrointestinal infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology*. 2020; 158(6): 1831–3.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.02.055>
10. Du M., Cai G., Chen F., Christiani D.C., Zhang Z., Wang M. Multi-omics evaluation of gastrointestinal and other clinical characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Gastroenterology*. 2020; 158(8): 2298–301. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.03.045>
11. Tian Y., Rong L., Nian W., He Y. Review article: gastrointestinal features in COVID-19 and the possibility of faecal transmission. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2020; 51(9): 843–51. <https://doi.org/10.1111/apt.15731>
12. Wang D., Hu B., Hu C., Zhu F., Liu X., Zhang J., et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*. 2020; 323(11): 1061–9. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585>
13. Vespa E., Pugliese N., Colapietro F., Aghemo A. Stay (GI) Healthy: COVID-19 and gastrointestinal manifestations. *Tech. Innov. Gastrointest. Endosc.* 2021; 23(2): 179–89. <https://doi.org/10.1016/j.tige.2021.01.006>
14. An P., Chen H., Ren H., Su L., Ji M., Kang J., et al. Gastrointestinal symptoms onset in COVID-19 patients in Wuhan, China. *Dig. Dis. Sci.* 2020; 66(10): 3578–87. <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06693-6>
15. Xu Y., Li X., Zhu B., Liang H., Fang C., Gong Y., et al. Characteristics of pediatric SARS-CoV-2 infection and potential evidence for persistent fecal viral shedding. *Nat. Med.* 2020; 26(4): 502–5. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0817-4>
16. Yang Z., Li G., Dai X., Liu G., Li G., Jie Y. Three cases of novel coronavirus pneumonia with viral nucleic acids still positive in stool after throat swab detection turned negative. *Chin. J. Dig.* 2020; 40: E002–E002. [https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0254-1432.2020.0002 \(in Chinese\)](https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0254-1432.2020.0002 (in Chinese))
17. Ling Y., Xu S.B., Lin Y.X., Tian D., Zhu Z.Q., Dai F.H., et al. Persistence and clearance of viral RNA in 2019 novel coronavirus disease rehabilitation patients. *Chin. Med. J. (Engl.)*. 2020; 133(9): 1039–43. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000774>
18. Zhang J.J., Dong X., Cao Y.Y., Yuan Y.D., Yang Y.B., Yan Y.Q., et al. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy*. 2020; 75(7): 1730–41. <https://doi.org/10.1111/all.14238>
19. Xiao F., Sun J., Xu Y., Li F., Huang X., Li H., et al. Infectious SARS-CoV-2 in feces of patient with severe COVID-19. *Emerg. Infect. Dis.* 2020; 26(8): 1920–2. <https://doi.org/10.3201/eid2608.200681>
20. VGARus. Russian platform for aggregating information about virus genomes. Available at: <https://genome.crie.ru/app/index> (accessed December 29, 2021).
21. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
22. Jevšnik M., Steyer A., Zrim T., Pokorn M., Mrvič T., Grosek Š., et al. Detection of human coronaviruses in simultaneously collected stool samples and nasopharyngeal swabs from hospitalized children with acute gastroenteritis. *Virol. J.* 2013; 10: 46. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-46>
23. Paloniemi M., Lappalainen S., Vesikari T. Commonly circulating human coronaviruses do not have a significant role in the etiology of gastrointestinal infections in hospitalized children. *J. Clin. Virol.* 2015; 62: 114–7. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.10.017>
24. Leung T.F., Chan P.K., Wong W.K., Ip M., Cheng W.T., Ng P.C. Human coronavirus NL63 in children: epidemiology, disease spectrum, and genetic diversity. *Hong Kong Med. J.* 2012; 18(Suppl. 2): 27–30.
25. Abdelghany T.M., Ganash M., Bakri M.M., Qanash H., Al-Rajhi A.M.H., Elhussieny N.I. SARS-CoV-2, the other face to SARS-CoV and MERS-CoV: Future predictions. *Biomed. J.* 2021; 44(1): 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.10.008>
26. Laxminarayan R., Mohan C.B., Vinay T.G., Arjun Kumar K.V., Wahl B., Lewnard J.A. SARS-CoV-2 infection and mortality during the first epidemic wave in Madurai, south India: a prospective, active surveillance study. *Lancet Infect. Dis.* 2021; 21(12): 1665–76. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00393-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00393-5)
27. Zhou J., Li C., Zhao G., Chu H., Wang D., Yan H.H., et al. Human intestinal tract serves as an alternative infection route for Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Sci. Adv.* 2017; 3(11): ea04966. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aao4966>
28. Donnelly C.A., Ghani A.C., Leung G.M., Hedley A.J., Fraser C., Riley S., et al. Epidemiological determinants of spread of causal agent of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *Lancet*. 2003; 361(9371): 1761–6. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13410-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13410-1)
29. Booth C.M., Matukas L.M., Tomlinson G.A., Rachlis A.R., Rose D.B., Dwosh H.A., et al. Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the greater Toronto area. *JAMA*. 2003; 289(21): 2801–9. <https://doi.org/10.1001/jama.289.21.JOC30885>
30. Lee N., Hui D., Wu A., Chan P., Cameron P., Joynt G.M., et al. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348(20): 1986–94. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030685>
31. Stockman L.J., Massoudi M.S., Helfand R., Erdman D., Siwek A.M., Anderson L.J., et al. Severe acute respiratory syndrome in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2007; 26(1): 68–74. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000247136.28950.41>
32. Ding Y., He L., Zhang Q., Huang Z., Che X., Hou J., et al. Organ distribution of severe acute respiratory syndrome (SARS) associated coronavirus (SARS-CoV) in SARS patients: implications for pathogenesis and virus transmission pathways. *J. Pathol.* 2004; 203(2): 622–30. <https://doi.org/10.1002/path.1560>
33. Moura I.B., Buckley A.M., Wilcox M.H. Can SARS-CoV-2 be transmitted via faeces? *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2022; 38(1): 26–9. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000794>
34. D'Amico F., Baumgart D.C., Danese S., Peyrin-Biroulet L. Diarrhea during COVID-19 infection: Pathogenesis, epidemiology, prevention, and management. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2020; 18(8): 1663–72. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2020.04.001>
35. Fratev F. N501Y and K417N mutations in the spike protein of SARS-CoV-2 alter the interactions with both hACE2 and human-derived antibody: a free energy of perturbation retrospective study. *J. Chem. Inf. Model.* 2021; 61(12): 6079–84. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c01242>