



БЕТАКОРОНАВИРУСЫ ЧЕЛОВЕКА И ИХ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНАЯ ДЕТЕКЦИЯ С ПОМОЩЬЮ ПЦР И ПРОЧИХ МЕТОДОВ АМПЛИФИКАЦИИ

¹Гарафутдинов Р.Р., ²Мавзютов А.Р., ^{3,4}Алексеев Я.И., ⁵Воробьев А.А., ¹Никоноров Ю.М., ¹Чубукова О.В., ¹Матниязов Р.Т., ^{1,2}Баймиев Ан.Х., ¹Максимов И.В., ^{1,2}Кулуев Б.Р., ^{1,2}Баймиев Ал.Х., ¹Чемерис А.В.

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450054, Уфа, Проспект Октября 71, E-mail: chemeris@anrb.ru

²Башкирский государственный медицинский университет, Россия, 450008, Уфа, ул. Ленина, 3

³ООО «Синтол», Россия, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, д. 42

⁴Институт аналитического приборостроения Российской академии наук, Россия, 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, д. 31/33

⁵Научно-исследовательский центр Федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Россия, 610017, г. Киров, Октябрьский проспект, 119

Резюме

Данный обзор посвящен преимущественно бетакоронавирусу SARS-CoV-2, вызвавшему в начале 2020 г. пандемию в виде опасной высококонтагиозной коронавирусной инфекции COVID-19 и рассмотренному вместе с близкими к нему вирусами SARS-CoV и MERS-CoV. Кратко приведена таксономия 2020 г. пандемию в виде опасной высококонтагиозной коронавирусной инфекции COVID-19 и рассмотренному бетакоронавирусов и их геномная организация, включая важную информацию о наличии у коронавирусов EhoN экзорибонуклеазы, ответственной за точность репликации. Даны сведения о секвенировании полных геномов коронавирусов SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2 и о геномах некоторых бетакоронавирусов из дикой природы, свидетельствующие о зоонозном происхождении коронавирусных инфекций у человека. Показана высокая консервативность нуклеотидных последовательностей различных штаммов и изолятов SARS-CoV-2 независимо от места их выделения. Продемонстрировано биоразнообразие бетакоронавирусов и возникновение в природе у рукокрылых новых генотипов путем рекомбинации, включая образование самого вируса SARS-CoV-2. Значительное внимание уделено детекции бетакоронавирусов SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 с помощью обратнo-транскрипционной ПЦР и прочих методов амплификации, в том числе приведена информация о существующих и разрабатываемых коммерческих наборах для диагностики COVID-19. Затронут вопрос о нахождении SARS-CoV-2 в окружающей среде, включая сточные воды, которые могут служить источником дополнительной информации о распространении этой инфекции, в том числе среди бессимптомных носителей. Рассмотрены некоторые нетривиальные вакцины против бетакоронавирусов и перспективы их применения. Сделан вывод о недостаточном внимании, уделявшемся в последние годы инфектологии, и необходимости быть в полной готовности к возможным будущим инфекциям, включая ведение постоянного мониторинга и разработку отечественного современного высокотехнологичного оборудования и диагностических тест-систем, а также производство расходных материалов.

Ключевые слова: бетакоронавирус, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, геном, РНК, секвенирование, нуклеокапсидный белок, COVID-19, диагностика, ПЦР в реальном времени, петлевая амплификация, ДНК-вакцина

Цитирование: Гарафутдинов Р.Р., Мавзютов А.Р., Алексеев Я.И., Воробьев А.А., Никоноров Ю.М., Чубукова О.В., Матниязов Р.Т., Баймиев Ан.Х., Максимов И.В., Кулуев Б.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Бетакоронавирусы человека и их высокочувствительная детекция с помощью ПЦР и прочих методов амплификации // Биомика. 2020. Т.12(1). С. 121-179. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-7

© Автор(ы)

**HUMAN BETACORONAVIRUSES AND THEIR HIGHLY SENSITIVE
DETECTION BY PCR AND OTHER AMPLIFICATION METHODS**

¹Garafutdinov R.R., ²Mavzyutov A.R., ^{3,4}Alekseev Ya.I., ⁵Vorobev A.A., ¹Nikonorov Yu.M., ¹Chubukova O.V.,
¹Matniyazov R.T., ¹Baymiev An.Kh., ¹Maksimov I.V., ^{1,2}Kuluev B.R., ¹Baymiev Al.Kh., ¹Chemeris A.V.

¹Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences,
71 Pr. Oktyabrya, 450054, Ufa, Russia, E-mail: chemeris@anrb.ru

²Bashkir State Medical University, 3 Lenina Str., 450008, Ufa, Russia

³Syntol Ltd, 42 Timiryazevskaya str., 127550, Moscow, Russia

⁴Institute for Analytical Instrumentation RAS, 31/33 Ivana Chernyh str., 198095, St. Petersburg, Russia

⁵Research Center of the Federal State Budgetary Institution "48 Central Research Institute" of the Ministry of Defense
of the Russian Federation, 119 Oktyabr'skiy prospekt, 610017, Kirov, Russia

Resume

This review focuses primarily on betacoronavirus SARS-CoV-2, which caused a pandemic in early 2020 in the form of a dangerous highly contagious coronavirus infection COVID-19, considered together with the closely related viruses SARS-CoV and MERS-CoV. The taxonomy of betacoronaviruses and their genomic organization is briefly presented, including important information about the presence of ExoN exoribonuclease in coronaviruses, which is responsible for replication accuracy. Data on the sequencing of complete genomes of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 coronaviruses and on the genomes of some betacoronaviruses from the wild are given, indicating the zoonotic origin of coronavirus infections in humans. High conservativeness of the nucleotide sequences of various SARS-CoV-2 strains and isolates, regardless of their isolation location, is shown. The biodiversity of betacoronaviruses and the emergence of new genotypes in the wild in bats by recombination, including the formation of the SARS-CoV-2 virus itself, have been demonstrated. Considerable attention is paid to the detection of betacoronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2 using reverse transcription PCR and other amplification methods, including information about existing and developing commercial kits for COVID-19 diagnostics. The issue of the presence of SARS-CoV-2 in the environment, including wastewater, which can serve as a source of additional information about the spread of this infection, including among asymptomatic carriers, was raised. Some non-trivial vaccines against betacoronaviruses and their application prospects are considered. It is concluded that insufficient attention has been paid to infectious science in recent years, and the need for full preparedness for possible future infections, including constant monitoring and development of domestic modern high-tech equipment and detection kits, as well as the production of consumables.

Keywords: betacoronavirus, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, COVID-19, genome, RNA, sequencing, nucleocapsid protein, diagnostics, real-time PCR, LAMP, loop amplification, DNA-vaccine

Citation: Garafutdinov R.R., Mavzyutov A.R., Alekseev Ya.I., Vorobev A.A., Nikonorov Yu.M., Chubukova O.V., Matniyazov R.T., Baymiev An.Kh., Maksimov I.V., Kuluev B.R., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. Human betacoronaviruses and their highly sensitive detection by PCR and other amplification methods. *Biomcs.* 2020. V.12(1). P. 121-179. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-7

© **The Author(s)**

	Содержание	Стр.
Введение		123
Таксономия коронавирусов		125
Геномная организация бетакоронавирусов		126
Нуклеотидные последовательности некоторых бетакоронавирусов человека и их зоонозное происхождение		127
Биоразнообразие бетакоронавирусов и возникновение новых генотипов		132
Детекция бетакоронавирусов с помощью ПЦР		137
Детекция бетакоронавирусов с помощью прочих методов амплификации		140
Массовая детекция SARS-CoV-2 с помощью разных диагностических тест-систем, в том числе отечественных		143
SARS-CoV-2 и окружающая среда		145

Нетривиальные вакцины против бетакоронавирусов	147
Заключение	149
Приложение	151
Литература	153
References	166

Content	Pages
Introduction	123
Taxonomy of coronaviruses	125
Genomic organization of betacoronaviruses	126
Nucleotide sequences of certain human betacoronaviruses and their zoonotic origin	127
Biodiversity of betacoronavirus and emergence of new genotypes	132
Detection of betacoronaviruses using PCR	137
Detection of betacoronaviruses using other amplification methods	140
Mass detection of SARS-CoV-2 using various diagnostic test systems, including domestic ones	143
SARS-CoV-2 and the environment	145
Non-trivial vaccines against betacoronaviruses	147
Conclusion	149
Supplement	151
References (in Russian)	153
References	166

Введение

11 марта 2020 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) объявила о пандемии коронавирусной инфекции SARS-CoV-2, приводящей к заболеванию, получившему 11 февраля 2020 г. на медиа-брифинге ВОЗ название COVID-19.¹ На тот момент в мире (далеко не во всех странах) было зафиксировано более 118 тысяч заболевших, из которых свыше 4 тысяч скончались. По состоянию на 3 апреля 2020 г. (всего через три недели) число больных составило уже 1 миллион 118 тысяч, а умерших почти 59 тысяч.

Мир впервые узнал о SARS-CoV-2 после того, как 31 декабря 2019 г. власти Китайской Народной Республики (КНР) официально поставили в известность ВОЗ о том, что в госпиталях города Ухань оказалось несколько человек с диагнозом «нетипичная пневмония». Уже в начале января 2020 г. был идентифицирован возбудитель, оказавшийся новым коронавирусом, что удалось понять при сравнении нуклеотидных последовательностей с другими коронавирусами, в том числе с вызывавшим ранее атипичную пневмонию, получившую название SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome²). Возбудитель новой инфекции называли Wuhan virus, WHCV, hCoV-19, WH20, 2019-nCoV, но в итоге этот

коронавирус 11 февраля (как и название вызываемой им болезни) получил от Международного комитета по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV) наименование SARS-CoV-2. Одновременно было предложено обозначать новые изоляты по следующей форме SARS-CoV-2/host/location/isolate/date [Gorbalenya et al. - Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2020].

До этого были известны шесть коронавирусов, заражающих человека, два из которых (HCoV-229E, HCoV-OC43) были описаны еще в 1966 и 1967 годах соответственно. В 2002 г. «объявился» новый коронавирус SARS-CoV, в 2003 – 2005 гг. были выявлены коронавирусы HCoV-NL63 и HCoV-NKU1. В 2012 г. на Ближнем Востоке был обнаружен еще один коронавирус - MERS-CoV. HCoV-229E и HCoV-NL63 относятся к альфакоронавирусам, а HCoV-OC43 и HCoV-NKU1 классифицированы как бетакоронавирусы [Liu et al., 2016]. И теперь, спустя почти десятилетие, стало известно о новом коронавирусе SARS-CoV-2, также относящемся к бетакоронавирусам. Коронавирусы HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 и HCoV-NKU1 вызывают респираторные инфекции слабой и средней тяжести, тогда как SARS-CoV и MERS-CoV, а теперь и SARS-CoV-2 у многих людей обуславливают уже более серьезную патологию дыхательной системы, в том числе диффузное поражение легочной ткани, и сопровождаются высокой летальностью.

Учитывая опасность, исходящую от SARS-CoV-2, этой проблеме практически сразу стали

¹ [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it)

² В России SARS называли ТОРС – Тяжелый Острый Респираторный Синдром.

уделять повышенное внимание, создавать многочисленные информационные сайты³. Многие ведущие научные издательства еще в январе 2020 г. сообщили, что доступ ко всем статьям по коронавирусам будет свободным, что, безусловно, помогает оперативно следить за новой информацией об этом вирусе. Такого взрывного количества публикаций по конкретной теме не было, наверное, никогда. Если в PubMed задать поиск со словом «coronavirus» без каких-либо ограничителей (Title, Abstract и пр.), то можно видеть, что интерес к этим объектам в последние месяцы резко возрос. Первый всплеск интереса к коронавирусам в этом тысячелетии отмечался в 2003 г. и он связан с появлением опасного коронавируса SARS-CoV, что вылилось в 631 публикацию, тогда как в 2002 г. таковых было всего 129. В 2004 - 2006 гг. статьи по этой тематике продолжали выходить с постепенным снижением их количества, но появление на Ближнем Востоке еще одного опасного бетакоронавируса MERS-CoV вернуло повышенный интерес к коронавирусам, который достиг того же уровня, что и был в 2003-2006 гг., оставаясь на нем вплоть до 2019 г., в котором вышли 694 публикации со словом «coronavirus». Что касается 2020 г., то только за первые три месяца статей о коронавирусах, согласно базе данных PubMed, опубликовано уже более 2500.

В Российской Федерации создан специальный сайт <https://стопкоронавирус.пф>, где сосредоточена вся необходимая информация о COVID-19 и приводятся обновляемые сведения о заболевших, вылечившихся и умерших, которых на 3 апреля 2020 г. было 4149, 281 и 34 соответственно. К сожалению, динамика распространения данной инфекции в России внушает определенную тревогу. Почти во всех странах продолжается рост инфицирования людей этим вирусом и предпринимаются беспрецедентные меры по предотвращению дальнейшего распространения инфекции, среди которых на сегодняшний день (пока не создана действенная вакцина) наиболее эффективными являются карантин и самоизоляция людей. При этом важное значение как для лечения, так и для профилактики⁴ имеет ранняя диагностика этиологического агента,

представляющего собой РНК-вирус, осуществляемая с помощью обратнo-транскрипционной ПЦР и других подходящих методов амплификации нуклеиновых кислот, что является главной темой данной статьи, наряду с краткой информацией о геномной организации бетакоронавирусов, их биоразнообразии и о некоторых нетривиальных вакцинах.

Ключевым параметром эпидемии служит базовый показатель воспроизводства инфекции, который равен числу людей, которых может заразить некий носитель, и чем этот показатель выше, тем заразнее болезнь и мощнее эпидемия/пандемия. Надо заметить, что распространение любой инфекции несколько напоминает амплификацию нуклеиновых кислот с экспоненциальным ростом числа ампликонов, но если для повышения эффективности таких реакций требуется, чтобы коэффициент размножения был как можно выше, то в случае с инфекцией наоборот – желательно, чтобы он был как можно ниже. Для лучшего размножения ампликонов нужно, чтобы олигонуклеотидные праймеры отжигались на как можно большем числе мишеней, а затем ДНК полимеразы достраивала по всем этим мишеням-матрицам новые цепи ДНК до конца, поскольку если этого не произойдет, то эффект от отжига праймера будет нивелирован. Продолжая аналогию с инфекцией, можно сказать, что отжиг праймера может быть соотнесен со встречей носителя инфекции со здоровым человеком, но «возьмет ли того зараза», чтобы распространяться дальше, еще не факт (что зависит, среди прочего, и от состояния иммунной системы подвергнувшегося инфекционной атаке), и это напоминает работу соответствующей ДНК полимеразы по элонгации цепей ДНК, которая может быть соотнесена с контагиозностью инфекционного агента. Эффективность работы полимеразы определяется в том числе наличием ингибиторов в реакционной смеси, которая для каждого человека (взятого у него образца) может, хотя и ненамного, но отличаться. Теоретически коэффициент размножения в ПЦР в каждом цикле составляет 2, то есть одна цепь ДНК порождает еще одну. Таким образом, через месяц (30 дней, которые можно представить циклами в ПЦР; день - цикл) один больной (носитель инфекции), заражая только одного нового индивида, мог бы привести к более чем миллиарду заболевших согласно формуле 2^N , где N – число циклов/дней⁵. Но на практике такого не происходит, поскольку первые заболевшие в какой-то момент прекращают заражать других людей, будучи, например, изолированными от общества с последующими разными исходами. Но наибольший

³ Здесь имеются в виду сайты, содержащие исключительно научную информацию, о которых будет говориться далее. Множество других сайтов, предоставляющих различную информацию о коронавирусной инфекции, в данной статье останутся без внимания.

⁴ Для максимально быстрого установления всех контактировавших с заболевшим и проверки у них наличия коронавирусной инфекции с целью дальнейшей изоляции.

⁵ 2^N – это очень упрощенный подсчет протекания ПЦР, но для данной статьи им можно ограничиться.

вклад в остановку эпидемического процесса вносит повышение количества невосприимчивых людей, перенесших заболевание, или же вакцинированных - своего рода еще одних «ингибиторов амплификации». И в этом заключается основное отличие эпидемического процесса от реакций амплификации нуклеиновых кислот, в которых все полноразмерные ампликоны из предыдущих циклов продолжают служить матрицами для дальнейших отжигив на них праймеров и элонгации последних. Предпосылкой для выстроенного выше сопоставления ПЦР и коронавиральной инфекции стали появившиеся в интернете расчеты, согласно которым через 100 дней один заболевший при коэффициенте 1,15 (то есть при увеличении числа заразившихся каждый день на 15%) инфицирует свыше миллиона здоровых ($1,15^{100}$). В действительности, прогноз развития инфекций, подобных COVID-19 с длительным латентным периодом, осуществляется с помощью целой системы дифференциальных уравнений по принципу SEIR (Susceptible-Exposed-Infected-Recovered), принимая в расчет, что иммунитет к этому вирусу у людей обрывается. В реальности даже 15%-ное ежедневное приращение - это крайне много, и его необходимо снижать. Как известно, любая реакция амплификации нуклеиновых кислот рано или поздно выходит на плато. Точно также и любая инфекция по разным причинам должна достигнуть пика и выйти на плато, после чего пойти на спад. Причем в этом случае - пока отсутствует вакцина, не образовался коллективный иммунитет - наилучшим противодействием распространению эпидемии служит снижение количества контактов зараженных людей со здоровыми. И если в амплификации

нуклеиновых кислот, изменив условия реакции, можно легко ликвидировать саму возможность отжига праймеров, без которого и полимеразе «работать не с чем», то с сообществом людей в дополнение к принимаемым административным мерам следует рассчитывать лишь на их сознательность и понимание ситуации.

Здесь остается еще добавить, что в случае с распространением COVID-19 как такового «нулевого» пациента – единственного носителя SARS-CoV-2 (с которого «пошла» амплификация и когда эта инфекция уже начала фиксироваться), как будет видно из дальнейшего изложения, по сути, и нет, но при этом индекс заразности нового бетакоронавируса довольно высок, что позволило вызываемой им болезни COVID-19 распространиться так широко за относительно короткое время.

Таксономия коронавирусов

Коронавирусы (род *Coronavirus*), получившие свое название по строению вириона, имеющего оболочку с шиповидными отростками и напоминающего солнечную корону, являются членами большого реалма РНК-вирусов *Riboviria*. Согласно последней номенклатуре вирусов Virus Taxonomy: 2018b Release, Email ratification February 2019 (MSL #34), приведенной на сайте <https://ictv.global/taxonomy/> Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV) [Lefkowitz et al., 2017; Walker et al., 2019] коронавирусы входят в порядок *Nidovirales*, субпорядок *Cornidovirineae*, семейство *Coronaviridae*, подсемейство *Orthocoronavirinae* (рис. 1).

– Order: <i>Nidovirales</i>	Realm: <i>Riboviria</i>	7 suborders
+ Suborder: <i>Abnidovirineae</i>	Order: <i>Nidovirales</i>	1 family
+ Suborder: <i>Amidovirineae</i>	Order: <i>Nidovirales</i>	1 family
– Suborder: <i>Cornidovirineae</i>	Order: <i>Nidovirales</i>	1 family
– Family: <i>Coronaviridae</i>	Suborder: <i>Cornidovirineae</i>	2 subfamilies
+ Subfamily: <i>Letovirinae</i>	Family: <i>Coronaviridae</i>	1 genus
– Subfamily: <i>Orthocoronavirinae</i>	Family: <i>Coronaviridae</i>	4 genera
+ Genus: <i>Alphacoronavirus</i>	Subfamily: <i>Orthocoronavirinae</i>	12 subgenera
+ Genus: <i>Betacoronavirus</i>	Subfamily: <i>Orthocoronavirinae</i>	5 subgenera
+ Genus: <i>Deltacoronavirus</i>	Subfamily: <i>Orthocoronavirinae</i>	4 subgenera
+ Genus: <i>Gammacoronavirus</i>	Subfamily: <i>Orthocoronavirinae</i>	2 subgenera

Рис. 1. Фрагмент номенклатуры вирусов порядка *Nidovirales*, включающего роды из подсемейства *Orthocoronavirinae* (<https://ictv.global/taxonomy/>)

Fig. 1. Fragment of the nomenclature of viruses of the order *Nidovirales*, including genera from the subfamily *Orthocoronavirinae* (<https://ictv.global/taxonomy/>)

Как можно видеть из рис. 1, подсемейство *Orthocoronavirinae* включает в себя четыре рода коронавирусов – *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*,

Deltacoronavirus и *Gammacoronavirus*. Виды, составляющие род бетакоронавирусов, приведены на рис. 2.

— Genus: <i>Betacoronavirus</i>	Subfamily: <i>Orthocoronavirinae</i>	5 subgenera
— Subgenus: <i>Embecovirus</i>	Genus: <i>Betacoronavirus</i>	4 species
Species: <i>Betacoronavirus 1</i> Subgenus: <i>Embecovirus</i>		
Species: <i>China Rattus coronavirus HKU24</i> Subgenus: <i>Embecovirus</i>		
Species: <i>Human coronavirus HKU1</i> Subgenus: <i>Embecovirus</i>		
Species: <i>Murine coronavirus</i> Subgenus: <i>Embecovirus</i>		
— Subgenus: <i>Hibecovirus</i>	Genus: <i>Betacoronavirus</i>	1 species
Species: <i>Bat Hp-betacoronavirus Zhejiang2013</i> Subgenus: <i>Hibecovirus</i>		
— Subgenus: <i>Merbecovirus</i>	Genus: <i>Betacoronavirus</i>	4 species
Species: <i>Hedgehog coronavirus 1</i> Subgenus: <i>Merbecovirus</i>		
Species: <i>Middle East respiratory syndrome-related coronavirus</i> Subgenus: <i>Merbecovirus</i>		
Species: <i>Pipistrellus bat coronavirus HKU5</i> Subgenus: <i>Merbecovirus</i>		
Species: <i>Tylonycteris bat coronavirus HKU4</i> Subgenus: <i>Merbecovirus</i>		
— Subgenus: <i>Nobecovirus</i>	Genus: <i>Betacoronavirus</i>	2 species
Species: <i>Rousettus bat coronavirus GCCDC1</i> Subgenus: <i>Nobecovirus</i>		
Species: <i>Rousettus bat coronavirus HKU9</i> Subgenus: <i>Nobecovirus</i>		
— Subgenus: <i>Sarbecovirus</i>	Genus: <i>Betacoronavirus</i>	1 species
Species: <i>Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus</i> Subgenus: <i>Sarbecovirus</i>		
Species: <i>Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus</i> Subgenus: <i>Sarbecovirus</i>		

Рис. 2. Фрагмент номенклатуры вирусов рода *Betacoronavirus*, включающего несколько подродов и ряд видов (<https://ictv.global/taxonomy/>)

Fig. 2. Fragment of the nomenclature of viruses of the genus *Betacoronavirus*, which includes several subgenera and a number of species (<https://ictv.global/taxonomy/>)

Согласно теме данной статьи основной интерес представляют виды из подродов *Sarbecovirus* и *Merbecovirus*, среди которых имеются возбудители опасных инфекционных заболеваний человека, а именно три вида, получивших обозначение (по хронологии их обнаружения) как SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2. Причем последнему будет уделено наибольшее внимание, поскольку именно этот вирус является этиологическим агентом COVID-19. Однако для сравнения будет привлечен и один вид альфакоронавирусов, также вызывающий инфекционное заболевание схожей этиологии у человека, но менее серьезное.

Геномная организация бетакоронавирусов

Генетическая информация коронавирусов представлена в виде (+)-цепи линейной одноцепочечной РНК, представляющей собой по сути мРНК. Транскрипционный процесс у коронавирусов происходит путем синтеза с помощью РНК-зависимой РНК-полимеразы негативной цепи, служащей в дальнейшем матрицей для наработки (+)-цепей РНК. Размеры геномов у большинства известных коронавирусов варьируют от 27 до 32 тысяч нуклеотидов. GC-состав геномной РНК коронавирусов колеблется около 40%.

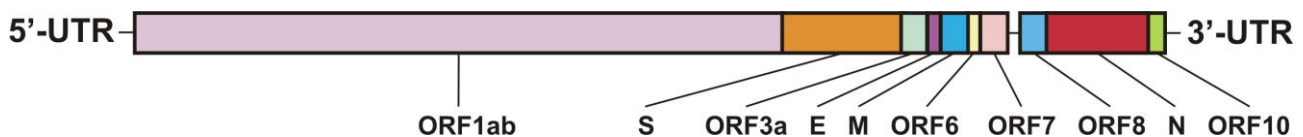


Рис. 3. Упрощенная схема геномной организации бетакоронавирусов (масштаб не соблюден). 5'-UTR – 5'-нетранслируемая область, ORF1a/b(replicase /transcriptase) кодирует 16 неструктурных белков (NSP), S - белок зубца короны (spike), E - малый белок оболочки (envelope), M - мембранный гликопротеин (membrane), N - нуклеокапсидный белок (nucleocapsid), 3'-UTR - 3'-нетранслируемая область

Fig. 3. Simplified scheme of genomic organization of betacoronaviruses (not scaled).

5'-UTR - 5'-untranslated region, ORF1a/b (replicase / transcriptase) encodes 16 non-structural proteins (NSP), S - spike protein, E - small envelope protein, M - membrane glycoprotein, N - nucleocapsid protein, 3'-UTR - 3'-untranslated region

Коронавирусная РНК имеет на 5'-конце метилированный кэп и нетранслируемую область протяженностью 200 - 400 нуклеотидов. На 3'-конце молекулы РНК также имеется нетранслируемая область из 200 - 400 нуклеотидов и затем поли(А)-последовательность. Функциональным ролям этих 5'- и 3'-нетранслируемых областей, которые еще не до конца ясны, посвящен специальный обзор [Yang, Leibowitz, 2015], и поэтому на этом вопросе мы останавливаться не будем. У бетакоронавирусов первая открытая рамка считывания (ORF1a/b – replicase/transcriptase) занимает около двух третей всего генома и кодирует 16 неструктурных белков (NSP), изначально организованных в два полипептида 1a и 1b, обеспечивающих процессы, как репликации, так и транскрипции. Далее следуют четыре ORFs, кодирующие четыре структурных белка – белок зубца короны S (spike), малый белок оболочки E (envelope), мембранный гликопротеин M (membrane), нуклеокапсидный белок N (nucleocapsid). Кроме них имеется еще ряд вспомогательных белков, в том числе с неизвестной функцией. Геном коронавируса упрощенно может быть записан следующим образом – 5'-UTR-ORF1a/b-S-E-M-N-UTR-3'-polyA (рис. 3).

Наиболее существенной особенностью коронавируса является наличие у них редактирующей активности за счет наличия экзорибонуклеазы (ExoN), функции которой выполняет белок NSP14 [Minskaia et al., 2006; Sevajol et al., 2014]. Данная редактирующая активность позволяет поддерживать бетакоронавирусам относительно высокую точность репликации и снижает число ошибок (мутаций)⁶, что достаточно важно для вируса с большим РНК-геномом. Следствием этого является относительно высокая консервативность нуклеотидных последовательностей у разных изолятов, что будет видно из дальнейшего изложения. Относительно низкая вариабельность геномов SARS-CoV-2 важна и для человечества, поскольку позволяет надеяться, что можно создать вакцину, которую не потребуются менять каждый год.

Функции некоторых неструктурных белков неясны, для большинства же она известна, но кроме экзорибонуклеазы NSP14 стоит упомянуть, пожалуй, только некоторые. Так, NSP3 блокирует иммунный ответ хозяина и индуцирует экспрессию цитокинов

⁶ Необходимо заметить, что даже среди специалистов бытует мнение, что все РНК-вирусы быстро мутируют, ввиду того, что их РНК-зависимая-РНК-полимеразная активность не позволяет осуществлять «редактирование» строящейся цепи и удалять неверно вставленные нуклеотиды, но в случае бетакоронавирусов это не соответствует действительности.

(цитокиновый «шторм»); NSP12 представляет собой РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp); NSP7 и NSP8 являются кофакторами белка NSP12, формируя комплекс, уникальный для коронавируса; NSP10 – кофактор белка NSP14, являющегося ExoN экзорибонуклеазой; NSP13 – РНК геликаза; NSP15 – эндорибонуклеаза; NSP16 – метилтрансфераза [te Velthuis et al., 2012; Kirchdoerfer, Ward, 2019; Ogando et al., 2019; Chen et al., 2020; Gao et al., 2020]. Также стоит отметить, что S белки зубцов короны отвечают за тропность вируса [Hulswit et al., 2016].

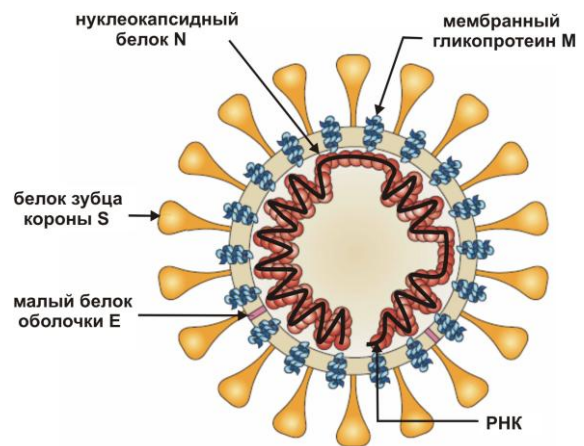


Рис. 4. Схематичное изображение бетакоронавируса
Fig. 4. Schematic image of betacoronavirus

Размер вириона бетакоронавирусов в диаметре составляет около 120 нм (рис. 4). При этом коронавирусы несут самую длинную среди известных к настоящему времени у РНК-вирусов молекулу несегментированной РНК.

Нуклеотидные последовательности некоторых бетакоронавирусов человека и их зоонозное происхождение

В ноябре 2002 г. в китайской провинции Гуандонг были выявлены случаи атипичной пневмонии, при этом в одной из работ математическим анализом было определено, что первоначальный штамм появился еще в августе-сентябре 2002 г. [Lu et al., 2004]. Эта инфекция затем распространилась на 32 страны, а число заболевших превысило 8 тысяч человек, унеся жизни приблизительно 800 человек⁷. Таким образом, смертность от этой инфекции составила около 10%, что довольно много, однако контагиозность этиологического агента оказалась не столь высока. При этом данная атипичная пневмония продолжалась относительно недолго, и последний

⁷ В разных источниках можно встретить несколько отличающие данные по этой инфекции, впрочем, как и по остальным.

заболевший был зафиксирован на Тайване в июле 2003 г. Этиологическим агентом этой инфекции явился бетакоронавирус, обозначенный как SARS-CoV. О том, что это коронавирус, удалось выяснить путем рандомизированной обратной-транскрипционной ПЦР с 15 парами праймеров, часть из которых несли вырожденные нуклеотиды, с последующим секвенированием трехсотнуклеотидного фрагмента, сравнительный анализ которого по GenBank показал сходство с рядом уже известных коронавирусов [Drosten et al., 2003].

В те годы технологии полногеномного секвенирования еще не существовало, и достаточно длительное время потребовалось для определения всей нуклеотидной последовательности этого вируса. Так, только в конце апреля - начале мая 2003 г. были «прочитаны» полные геномы четырех изолятов SARS-CoV, секвенированные разными группами авторов. 21 апреля под регистрационным номером AY278741 международным консорциумом ученых, из которых большинство было представлено американскими специалистами [Rota et al., 2003], была помещена в GenBank последовательность протяженностью 29727 нуклеотидов изолята коронавируса Urbani, названного так по фамилии эксперта ВОЗ в Гонконге, который первым в конце февраля подробно описал симптомы атипичной пневмонии и скончавшегося от ее осложнений. 28 апреля группа ученых из Гонконга зарегистрировала в базе данных под номером AY278554 последовательность из 29736 нуклеотидов изолята CUHK-W1 [Tsui et al., 2003]. Канадские ученые 1 мая 2003 г. сообщили о завершении секвенирования изолята TOR2, имевшего несколько большую протяженность - 29751 нуклеотидов (регистрационный номер - NC_004718) [Marra et al., 2003]. Более коротким оказался геном у изолята BJ01 (29725 нуклеотидов), которому был присвоен регистрационный номер AY278488. Этот проект был выполнен группой ученых из Пекинского института геномных исследований [Wu et al., 2003]. После этого во многих странах были секвенированы полные геномы местных изолятов коронавирусов SARS-CoV. В России также был секвенирован изолят SoD [Onishchenko et al., 2004]. Размер его генома оказался равным 29715 нуклеотидам. При построении филогенетического древа для 36 известных полных геномов SARS-CoV было обнаружено, что штамм SoD наиболее близок к выделенному ранее во Франкфурте, от которого его отличали только три нуклеотидные замены, приводящие к двум заменам аминокислот.

Активные поиски промежуточного хозяина коронавируса SARS-CoV позволили обнаружить близкородственные ему вирусы у ряда видов диких животных, продающихся на рынках юга Китая [Lai, 2003; Kan et al., 2005; Wang, Eaton, 2007]. Секвенирование

геномов коронавирусов, выделенных от цивет *Paguma larvata* из семейства виверовых, показало, что за исключением небольшого дополнительного участка эти вирусы оказались практически идентичными таковым, выделенным от больного человека.

Эта информация послужила дополнительным доказательством того, что неожиданное возникновение инфекции вызвано тем, что вирус «перешагнул» межвидовой барьер, и иммунная система нового хозяина оказалась не готова к защите от него. Точно также и сам вирус не сформировал совместимости к новому хозяину, поскольку основной стратегией практически любого вируса (патогена) можно считать не быстрое уничтожение своего хозяина, а обеспечение возможности размножиться в нем достаточно долго, не доводя до летального исхода. Что послужило последним толчком к тому, что этот коронавирус приобрел инфекционность для человека, до сих пор сказать трудно, но одно из наиболее вероятных предположений может быть связано с произошедшими мутациями (рекомбинациями) вируса, и что такой измененный вирус «встретил» восприимчивого к нему человека. Весьма вероятно, что этот бетакоронавирус «проник» в человека вместе с недожаренным мясом диких животных, поскольку на юге Китая некоторые дикие животные, включая цивет, употребляются в пищу как деликатесы.

Хотя считается, что последний случай заражения коронавирусом SARS-CoV был отмечен в начале июля 2003 г., тем не менее, сообщалось еще о четырех заболевших в период между 16 декабря 2003 г. и 8 января 2004 г. в китайской провинции Гуандонг [Song et al., 2005]. Их всех госпитализировали с подозрением на грипп, но затем выяснилось, что это был SARS. Однако течение болезни было легким. При этом один из госпитализированных был работником ресторана, в котором подавали цивет, двое других обедали в этом и соседнем ресторанах. Выделенные у них и от цивет вирусы были секвенированы. Проведенное сравнение, включающее еще 89 других полногеномных последовательностей SARS-CoV и двух коронавирусов цивет, секвенированных ранее, показало довольно высокий уровень гомологии. При этом последовательности РНК вирусов, выделенные у одного из посетителей ресторана и у одной из цивет, отличались всего на 33 нуклеотида (около 99,9% гомологии), причем значительная их часть была локализованных во фрагменте, ответственном за кодирование рецептор-связывающего домена. В целом эти результаты еще раз подтвердили, что промежуточным хозяином при передаче вируса от летучих мышей человеку оказались циветы. В другой работе было обнаружено, что замена двух аминокислотных остатков у цивет (N479K и T487S)

является критичной для передачи коронавируса от животного к человеку [Qu et al., 2005].

Но настоящим природным резервуаром для большинства коронавирусов являются летучие мыши, переносящие эти вирусы и не проявляющие признаков заболевания [Li et al., 2005]. Причем, как будет видно из дальнейшего изложения, для рукокрылых характерно большое разнообразие этих вирусов. Но скорее всего, непосредственно от них человеку эти вирусы передаваться не могут, и для этого необходим промежуточный хозяин. Если в случае с SARS-CoV таковым, вероятнее всего, послужили civets, то при передаче другого бетакоронавируса (о котором сейчас пойдет речь) от летучих мышей к человеку на Ближнем Востоке промежуточным хозяином оказались одногорбые верблюды или дромедары *Camelus dromedarius* [Alagaili et al., 2014; Azhar et al., 2014]. Так, 13 июня 2012 г. в Саудовской Аравии был госпитализирован первый заболевший новым коронавирусом, первоначально названным HCoV-EMC/2012 [Zaki et al., 2012]. Позже этот бетакоронавирус был переименован в MERS-CoV (Middle-East Respiratory Syndrome) [de Groot et al., 2013]. В России он был назван как БВРС (Ближневосточный Респираторный Синдром). При этом ретроспективным анализом установлено, что еще в апреле 2012 г. в Иордании зафиксированы случаи атипичной пневмонии, в том числе со смертельным исходом, вызванные, как полагают, MERS-CoV [Al-Abdallat et al., 2014]. Всего за эти годы число заболевших БВРС составило по всем странам около 2500 человек, а смертельные исходы отмечены для приблизительно 900 человек (более 30%), что значительно выше, чем от SARS-CoV. По счастью, MERS-CoV имеет еще меньшую контагиозность, чем его китайский «троюродный»⁸ «собрат».

Секвенирование геномов MERS-CoV проводилось уже с использованием появившихся технологий полногеномного секвенирования новых поколений. Так, пирофосфатным секвенированием была определена полная последовательность РНК штамма HCoV-EMC/2012, выявленного в Саудовской Аравии [van Boheemmen et al., 2012], принятая затем за референсную. Ее длина оказалась 30119 нуклеотидов. Чуть короче был геном у MERS-CoV коронавируса штамма England/Qatar/2012, выделенного в Англии у пациента из Катара – 30112 нуклеотидов [Cotten et al., 2013]. При этом гомология с референсным штаммом

составила 99,67%. Позже был секвенирован штамм MERS-CoV из Китая, показавший высокую гомологию с взятыми в анализ секвенированными до этого по всему миру 77 штаммами, варьирующую от 99,53% до 99,92% [Xie et al., 2015].

Отдельного внимания заслуживает вспышка этой болезни, произошедшая в 2015 г. в Южной Корее после того, как 68-летний кореец вернулся из Саудовской Аравии, заразившись там MERS-CoV [Korea Centers for Disease Control and Prevention, 2015]. Поскольку он до изоляции успел проконтактировать с приблизительно 600 людьми, то в результате более 16 тысяч человек были отправлены на домашний карантин. В итоге заболевших оказалось 186. Из этой когорты людей были выделены и секвенированы полные геномы четырех изолятов MERS-CoV, полученных от четырех человек, относящихся к четырем поколениям передачи этого вируса [Seong et al., 2016]. Сравнительный анализ секвенированных последовательностей с таковыми из Саудовской Аравии показал 99,8 – 99,9% совпадение, что лишний раз доказывает, что вирус мутирует не очень быстро ввиду наличия у него редактирующей активности, используемой при репликации. Между собой эти четыре южнокорейских изолята отличались единичными заменами нуклеотидов (от одного до пяти). Поскольку MERS-CoV, в отличие от SARS-CoV, не исчез из человеческой популяции, то и интерес к нему не пропал. Создаются и испытываются вакцины для борьбы с ним, разрабатываются диагностические тест-системы, но об этом будет говориться в следующих разделах этой статьи.

Активное исследование новой коронавирусной инфекции началось после того, как 26 декабря 2019 г. в центральный госпиталь Уханя был помещен рабочий с местного рынка морепродуктов, а через несколько дней (31 декабря) мир был извещен о возможной надвигающейся угрозе. Благодаря технологиям секвенирования ДНК новых поколений удалось очень быстро «прочитать» полный геном этиологического агента, который оказался бетакоронавирусом, отличающимся от других наиболее близких представителей подрода *Sarbecovirus* настолько (89,1% сходства), что дало основание считать его новым видом вируса [Wu et al., 2020]. Так, уже 10 января 2020 г. его нуклеотидная последовательность (принятую сейчас референсной) протяженностью 29903 нуклеотида появилась в GenBank под номером MN908947 (подвергнувшаяся затем двум ревизиям - 17 января и 18 марта 2020 г.). Проведенный анализ нуклеотидной последовательности [Wu et al., 2020] позволил установить, что данный вирус имеет стандартную для всех бетакоронавирусов организацию генома, приведенную выше на рис. 3. Авторы также спрогнозировали возможные рекомбинационные

⁸ «Троюродный» потому что SARS-CoV и SARS-CoV-2 между собой скорее следует считать «двоюродным» «собратьями», тем более, что они «нацелены» на одну и ту же мишень в виде ангиотензин-превращающего фермента 2, тогда как для MERS-CoV рецептором служит дипептидилпептидаза 4.

события S-белка, которые могут происходить у сарбековирусов.

Другой статьей, опубликованной, как и предыдущая, on-line 3 февраля 2020 г., стала работа, посвященная анализу сходства нового коронавируса (пяти полных геномов) с родственными ему вирусами летучих мышей и исчезнувшего из людской популяции вируса SARS-CoV [Zhou et al., 2020]. Было показано, что между собой изоляты, полученные от пяти пациентов, практически не отличались, тогда как со «старым» SARS-CoV они имели гомологию только 79,6%. При этом бетакоронавирус, изолированный из летучей мыши и обозначенный как Bat CoV RaTG13 (о котором еще будет идти речь), был гомологичен с SARS-CoV-2 на 96%.

Но первой on-line статьей, опубликованной 24 января 2020 г., стала работа других китайских авторов [Zhu et al., 2020]. Им с помощью комбинации флуоресцентного секвенирования на платформе Illumina и нанопорового секвенирования с финальным завершающим секвенированием по Сэнгеру удалось определить нуклеотидные последовательности полных геномов трех изолятов коронавируса (полученных у трех больных, помещенных в госпиталь в Ухане 27 декабря 2019 г.), которые 12 января 2020 г. были депонированы в базе данных GISAID - Global Initiative on Sharing All Influenza Data (<https://www.gisaid.org>). Проведенный анализ показал, что нуклеотидные последовательности этих изолятов совпадают с другими известными последовательностями РНК бетакоронавирусов не более чем на 90%, что также позволило счесть новые изоляты за самостоятельный новый вид, ставший седьмым, поражающим человека.

Позже последовало секвенирование множества полных геномов SARS-CoV-2 во многих странах. Сравнительный анализ геномов первых 30 секвенированных изолятов SARS-CoV-2 из разных стран показал, что они или полностью совпадали друг с другом, или отличались единичными заменами - числом от одной до семи [Cohen, 2020]. Причем по 5 - 7 замен несли единичные изоляты. Сравнение 54 нуклеотидных последовательностей изолятов SARS-CoV-2 из разных стран показали их высокую гомологию, превышающую 99% [Ceraolo, Giorgi, 2020]. При этом по данным этих авторов уже упоминавшийся изолят бетакоронавируса из летучей мыши Bat CoV RaTG13 показал 96,2% совпадение, что позволило им сделать вывод о зоонозном происхождении SARS-CoV-2. Другие авторы сравнили 95 полногеномных последовательностей SARS-CoV-2 со всего мира и обнаружили очень высокое сходство между ними, варьирующее от 99,91% до полного совпадения [Wang et al., 2020]. Причем в этой работе было оценено сходство не только всего генома, но и по отдельности

12 ORFs, кодирующих разные белки, а также сходство самих этих белков. Выделенный в Южной Корее изолят SARS-CoV-2 был секвенирован и показал гомологию в 99,9% с остальными 54 подобными изолятами вируса, тогда как с SARS-CoV и MERS-CoV гомология составила всего 77,5% и 50% соответственно [Kim et al., 2020]. Проведенное сравнение полных геномов секвенированного в Таиланде изолята SARS-CoV-2 с 23 родственными ему вирусами из разных стран продемонстрировало, что между ними имеется от 0 до максимум 9 различий, что крайне мало с учетом длины молекулы РНК почти в 30 тысяч нуклеотидов [Okada et al., 2020]. Как можно видеть из приведенных данных, SARS-CoV-2 не сильно меняется при передаче от человека к человеку, и даже межконтинентальные различия штаммов не выходят за те же рамки. И это крайне важно как для диагностики, так и для создания вакцин.

В Российской Федерации специалистами ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Смординцева» Минздрава России первый полный геном бетакоронавируса SARS-CoV-2 (изолят hCoV-19/Russia/StPetersburg-3524/2020) был секвенирован в середине марта 2020 г., а его последовательность депонирована в базе данных GISAID, но точность прочтения генома была невысока. Позже с высокой точностью в этом же Институте секвенированы еще два изолята – hCoV-19/Russia/StPetersburg-R113992/2020 и hCoV-19/Russia/StPetersburg-R113997/2020 протяженностью в 29903 нуклеотида каждый, информация о которых также депонирована в базе данных GISAID. При этом эти два изолята имели соответственно 4 и 10 однонуклеотидных замен по сравнению с референсной последовательностью SARS-CoV-2 (99,97% гомологии). Нуклеотидная последовательность четвертого изолята hCoV-19/Russia/Moscow_PMV-1/2020 (EPI_ISL_421275) определена в Москве, и его длина оказалась чуть короче – 29891 нуклеотид при 13 заменах по отношению к референсной последовательности SARS-CoV-2 и при чуть меньшей достоверности секвенирования.

Помимо баз данных GISAID и The National Center for Biotechnology Information (https://www.nlm.nih.gov/index.html#Novel_Coronavirus), в том числе специально аккумулирующей последовательности бетакоронавирусов, существует еще один ресурс - China National Center for Bioinformatics (<https://bigd.big.ac.cn/ncov?lang=en>), в котором по состоянию на 3 апреля 2020 г. содержатся сведения о 42330 последовательностях разных коронавирусах и 3256 – о последовательностях SARS-CoV-2. На этом сайте приводится много сопутствующей информации; указываются в том числе длина секвенированной последовательности и

точность секвенирования, имеющая пять градаций, отмечаемых зелеными или красными кружочками. Для всех изолятов бетакоронавирусов SARS-CoV-2 по их полным геномам (установленным с высокой достоверностью) создано филогенетическое древо (<https://bigd.big.ac.cn/ncov/tree>), с разноцветной идентификацией разных стран. Имеется ссылка на тот же самый GenBank, в котором к 3 апреля 2020 г. содержалось более 400 последовательностей SARS-CoV-2. При этом в NCBI реализована возможность построения on-line филогенетических древ по какому угодно количеству выбранных последовательностей - https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/virus?Seq_Type_s=Nucleotide&VirusLineage_ss=Wuhan%20seafood%20market%20pneumonia%20virus.%20taxid:2697049.

Недавно проведенный филогенетический сетевой анализ 160 полных геномов бетакоронавирусов SARS-CoV-2 показал, что разошедшиеся по миру вирусы сформировали три типа, обозначенных авторами как А, В и С [Forster et al., 2020]. Тип А наиболее близок предковому типу из летучей мыши, в качестве которого послужил штамм RaTG13 – он же был выбран и корневой точкой для проведенного анализа сходства нуклеотидных последовательностей. Хотя авторы попытались проследить распределение по миру отдельных типов, но четкой картины пока все же нет, поскольку все типы в той или иной пропорции присутствуют на всех материках. Более того, сходство нуклеотидных последовательностей различных изолятов SARS-CoV-2 (в том числе собранных в разных странах) очень большое, и они отличаются буквально заменами единичных нуклеотидов, если не принимать во внимание вариации в нетранслируемых 5'- и 3'-областях, а также неточности секвенирования, о которых на том же сайте базы данных GISAID пользователи предупреждаются кружочками красного и зеленого цветов.

Справедливости ради и для демонстрации имеющей место вариабельности SARS-CoV-2, следует указать на работу, в которой был выявлен не столько полиморфизм геномов нового бетакоронавируса, а обнаружена протяженная делеция размером 328 нуклеотидов, затрагивающая почти всю рамку считывания гена *nsp8* [Su et al., 2020]. Причем было показано, что вирусы с такой мутацией циркулировали в Сингапуре на протяжении четырех недель и потом, видимо, пропали. Авторы пришли к заключению, что это был ослабленный штамм, что, собственно, вполне объяснимо локализацией данной делеции, поскольку известно, что репликация коронавируса может происходить и без участия NSP7 и NSP8 белков, только идти она будет хуже [Subissi et al., 2014]. Ранее о делециях в 29 и 82 нуклеотида в этом же гене упоминалось в другой

работе, посвященной вопросам эволюции SAR-CoV [The Chinese SARS Molecular Epidemiology Consortium, 2004]. В этой связи нужно вспомнить еще одну относительно недавнюю работу, в которой был сконструирован вариант старого SARS-CoV, у которого была произведена делеция 29 нуклеотидов как раз в гене белка NSP8, что ослабило репликацию вируса [Muth et al., 2018].

Зоонозное происхождение бетакоронавирусов человека сомнений не вызывает [Ye et al., 2020]. И то, что источником бетакоронавируса SARS-CoV-2 оказались летучие мыши, также не вызывает разногласий, но кто стал промежуточным хозяином – вопрос до сих пор остается открытым, хотя проведенный поиск различных коронавирусов в дикой природе показал, что у чешуйчатых млекопитающих панголинов *Manis javanica*⁹ уже давно циркулирует вирус, имеющий высокую гомологию с SARS-CoV-2 [Lam et al., 2020; Zhang et al., 2020]. Сообщается, что работа велась с замороженными тканями панголинов, предоставленными таможней в Гуанчжоу в 2017 и 2018 гг. К сожалению, известна только частичная геномная последовательность коронавирусов, выделенных из этих панголинов, имеющая фрагментарный характер с общей длиной, равной 21505 нуклеотидов для варианта GD/P2S. Тем не менее, сравнительный анализ нуклеотидной и аминокислотной последовательностей рецептор-связывающего домена с аналогичными у референсного штамма SARS-CoV-2 показал, что на аминокислотном уровне они имеют 97,4% гомологии, тогда как между коронавирусами SARS-CoV-2 и Bat RaTG13 из летучей мыши *Rhinolophus affinis* для этих же участков она составляет лишь 89,2%. Причем наиболее критичные пять аминокислотных остатков полностью идентичны у SARS-CoV-2 и панголинов, тогда как у коронавируса Bat RaTG13 и коронавируса SARS-CoV-2 из этих пяти аминокислот совпадает только одна, замены же 4-х других теоретически могут приводить к изменению структуры рецептор-связывающего домена, а, следовательно, изменять эффективность проникновения вируса в клетку-хозяина.

Проведенный другими авторами анализ нуклеотидной последовательности SARS-CoV-2 на предмет частоты использования тех или иных кодонов при трансляции¹⁰ позволил им сделать,

⁹ Важным моментом в допущении возможности такой передачи является то, что панголинов продавали на том самом рынке в Ухане.

¹⁰ Несмотря на то, что генетический код, согласно которого каждая аминокислота кодируется своими триплеттами, для всех организмов един (если не

вывод, что таковая (частота) в большей степени совпадает с используемыми змеями [Ji et al., 2020] однако, насколько нам известно, бетакоронавирусов у рептилий еще не находили. Другой подход к выявлению промежуточного хозяина при передаче человеку основан на сравнении аминокислотных последовательностей ангиотензин-превращающего фермента ACE2, включая ряд наиболее ключевых аминокислот у разных видов животных и птиц, показавший, что таковыми (передаточным звеном) могли быть те же панголины, циветы, кошки, овцы, козы, буйволы, коровы, свиньи, а также голуби [Qiu et al., 2020]. В еще одной работе также при сравнении отдельных аминокислот в наиболее критичных местах ACE2 рецептора разных видов животных было предположено, что ни панголины, ни змеи не являются промежуточным хозяином SARS-CoV-2, а скорее всего им могут быть черепахи [Liu et al., 2020].

Биоразнообразие бетакоронавирусов и возникновение новых генотипов

Основным природным резервуаром коронавирусов являются не проявляющие при этом признаков заболевания рукокрылые [Lau et al., 2005; Li et al., 2005]. В последней работе с помощью серологических тестов и ПЦР анализа было исследовано 408 летучих мышей девяти видов, относящихся к шести родам и трем семействам, отловленных в трех провинциях Китая. При этом только у 22 из них были выявлены антитела к коронавирусам, и лишь в пяти образцах ПЦР показала наличие искомого фрагмента. При этом в ряде случаев эти тесты провести не удалось из-за низкого качества препарата. Для одного образца была определена полная последовательность РНК всего вируса, сравнение которой с вирусом атипичной пневмонии SARS-CoV показало высокий уровень гомологии, превышающий 92%. В другой работе исследовались пять видов летучих мышей из юго-восточных провинций Китая, но, как оказалось, только подковоносы (семейство Rhinolophidae) являются носителями коронавирусов, близких к SARS-CoV [Wang et al., 2017]. Секвенирование полного генома одного из изолятов и его сравнение с известными последовательностями других штаммов бетакоронавирусов позволило сделать вывод об их естественной рекомбинации. Таким образом, авторы посчитали, что летучие мыши – подковоносы являются собой не только резервуар подобных коронавирусов,

вдаваться в детали), за счет его избыточности существует возможность кодирования некоторых аминокислот различными кодонами, и разным группам организмов присуща некоторая избирательность при их выборе.

но и служат «миксерами», формирующими новые генотипы, играя важную роль в эволюции и распространении этих вирусов. Сходной точки зрения придерживаются и авторы другой статьи, посчитавшие, что образование в 2002 г. коронавируса SARS-CoV произошло в результате множественных рекомбинационных событий именно в подковоносах [Luk et al., 2019].

В результате пятилетних исследований другими авторами было показано, что даже в одном местообитании в популяции летучих мышей могут циркулировать очень разные вирусы [Hu et al., 2017]. Более того, было обнаружено, что у двух особей имело место ко-инфицирование сразу двумя штаммами коронавируса¹¹. При выполнении той работы были также секвенированы полные геномы 15 изолятов бетакоронавирусов летучих мышей из одной пещеры, сравнительный анализ которых показал, что они высоко варибельны по гену S белка и двум открытым рамкам считывания ORF3 и ORF8. При этом по отдельным участкам эти изоляты имели довольно высокое сходство с SARS-CoV, из чего был сделан вывод, что некий предшественник SARS-CoV мог возникнуть на основе рекомбинационных событий между разными штаммами. К тому же относительно трех изолятов с отличающимися последовательностями S белка было сделано предположение, что они способны в качестве рецептора использовать ACE2 человека. Тонкий анализ нуклеотидных последовательностей трех штаммов позволил определить точку рекомбинации и установить, какой из штаммов является минорным, а какой мажорным предком. И главный вывод, сделанный авторами статьи, звучит как предостережение о необходимости готовиться в будущем к новым вспышкам коронавирусных инфекций. Надо заметить, что в статьях тех лет неоднократно поднимался вопрос о возможности будущих вспышек коронавирусных инфекций и даже пандемий на их основе [Ng, Tan, 2017; Sheahan, Baric, 2018].

О рецепторе ACE2, специфичном рецепторному аппарату бетакоронавирусов, необходимо сказать отдельно. В частности, еще в 2003 г. было

¹¹ Ко-инфицирование одной особи разными штаммами коронавирусов представляет наибольшую опасность в плане возникновения новых генотипов, которые могут оказаться потенциально вредоносными для человека. Причем рекомбинационные события резко увеличивают скорость эволюции вирусов в отличие от обычных мутаций одиночных нуклеотидов, которые к тому же у коронавирусов подвергаются редактированию, о чем говорилось выше.

установлено, что рецептором для SARS-CoV является ACE2, с которым непосредственно взаимодействует S белок коронавируса [Li et al., 2003]. Исследования кристаллической структуры рецептор-связывающего домена SARS-CoV-2 и ACE2 белка человека, показали, что в отличие от SARS-CoV новый вирус образует более компактный комплекс. При этом выявленные замены ряда аминокислот дополнительно способствуют его стабилизации, что объясняет высокую контагиозность SARS-CoV-2 [Shang et al., 2020]. В результате рентгеноструктурного анализа рецептор-связывающего домена SARS-CoV-2 с ACE2 рецептором человека было установлено, что рецептор-связывающий домен у этих коронавирусов подвержен конвергентной эволюции, поскольку в целом SARS-CoV и SARS-CoV-2 филогенетически довольно далеки друг от друга [Lan et al., 2020]. При этом в экспериментах *in silico* было показано, что рецептор-связывающий домен SARS-CoV-2 и ACE2 рецептор человека отличается более высокой аффинностью [Ortega et al., 2020].

Проведенный недавно греческими специалистами анализ нескольких полных геномов бетакоронавирусов, включая SARS-CoV-2 и Bat CoV RaTG13, имеющих между собой в целом 96.3% гомологии, показал, что возбудитель COVID-19 является результатом недавнего рекомбинационного события [Paraskevis et al., 2020]. Однако, при сравнении по отдельности первых 11,5 тысяч нуклеотидов и последних 6 тысяч этих вирусов выяснилось, что они гораздо ближе друг к другу, чем они оказались же при сравнении их оставшейся средней части, позволив этим авторам сделать вывод, что штамм RaTG13 не является предшественником SARS-CoV-2. Другие авторы, проведя

биоинформатический анализ дивергенции геномов SARS-CoV-2 и Bat CoV RaTG13, пришли к выводу, что они имели общего предка, потенциально способного инфицировать человека [Cagliani et al., 2020].

Ранее в Китае был охарактеризован ряд коронавирусов, выделенных из летучих мышей *Rhinolophus sinicus*, среди которых был штамм RsSHC014 (о котором дальше еще пойдет речь) и использующих ACE2 рецептор [Ge et al., 2013]. Однако считать, что только китайские летучие мыши переносят коронавирусы, неверно, поскольку, например, близкие к MERS-CoV бетакоронавирусы обнаружены недавно в Финляндии [Kivistö et al., 2020], а ранее подобные коронавирусы выявлены в Италии [Moreno et al., 2017] и Болгарии [Drexler et al., 2010]. На африканском континенте родственные SARS-CoV коронавирусы были выявлены у летучих мышей в Кении [Tong et al., 2009]. Родственный MERS-CoV вирусу бетакоронавирус был также обнаружен у европейских ежей [Corman et al., 2014].

В большинстве работ, анализирующих геномы различных бетакоронавирусов, при сравнении нуклеотидных и аминокислотных последовательностей авторы обычно строят дендрограммы, наглядно демонстрирующие эволюционные взаимоотношения коронавирусов. Как уже говорилось выше, филогенетические деревья для выбранных геномов позволяет строить база данных The National Center for Biotechnology Information, тогда как на сайте ресурса China National Center for Bioinformation представлено пополняемое древо всех SARS-CoV-2 вирусов. Нами для построения дендрограмм была использована программа MegAlign из пакета Lasergene фирмы DNASTar, Inc.

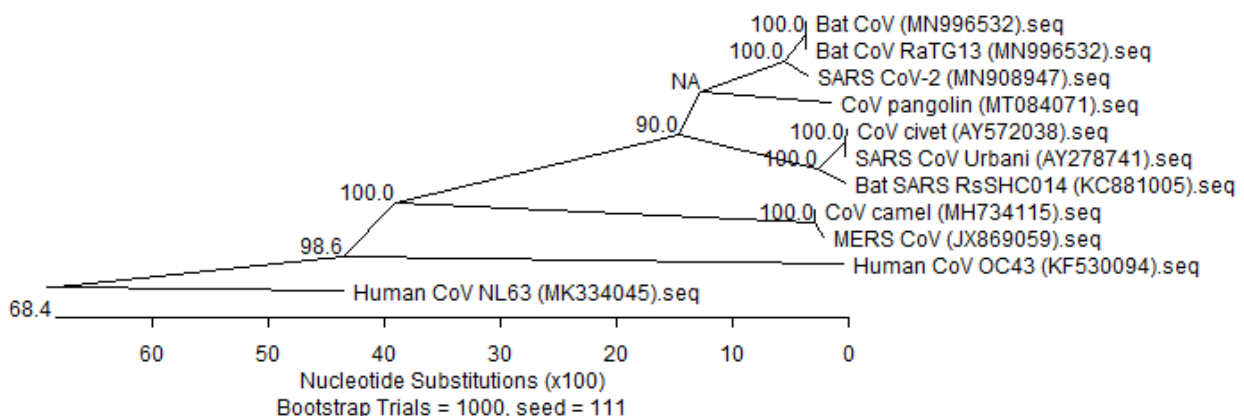


Рис. 5. Филогенетическое древо некоторых коронавирусов, построенное на основании сравнения их полных геномов. (Пояснения в тексте)

Fig. 5. Phylogenetic tree of some coronaviruses based on comparison of their complete genomes. (Explanations in the text)

Из представленного на рис. 5 филогенетического древа ряда видов и штаммов коронавируса видно, что подрод сарбековирусов формирует самостоятельную ветвь, подразделяющуюся на два кластера. На одном из них располагается «старый» коронавирус SARS-CoV вместе с коронавирусом летучей мыши Bat SARS RsSHC014 и CoV из циветы. Другой кластер формируют новый коронавирус SARS-CoV-2, ближе всего к которому на данном древе располагается штамм другого вида летучих мышей - Bat CoV RaTG13. Относительно филогенетически близко расположен штамм CoV панголина. Однако геном коронавируса панголинов еще полностью не секвенирован. По этой причине фактически сравнивались лишь секвенированные на данный момент фрагменты, и не исключено, что указанный коронавирус филогенетически окажется еще ближе к SARS-CoV-2 при сравнении полного генома. Другую ветвь формируют виды и штаммы подрода мербековирусы, к которым отнесен коронавирус

MERS-CoV человека и CoV верблюда. Более удаленные ветви наблюдаются для бетакоронавируса CoV OC43 и альфакоронавируса CoV NL63, послужившие здесь при множественном выравнивании внешними группами для построения корневой дендрограммы.

Известно, что нуклеокапсидный белок N играет ключевую роль в формировании вирионов у различных вирусов, и коронавирусы не являются исключением. Полагают, что мутации в кодирующем нуклеокапсидный белок гене могут оказывать серьезное влияние на инфекционность этих вирусов и, в частности, SARS-подобных коронавирусов [Benvenuto et al., 2020]. В связи с этим нами было проведено сравнение известных нуклеотидных последовательностей N белков нескольких коронавирусов и построено соответствующее филогенетическое древо (рис. 6). Результаты выравнивания нуклеотидных последовательностей данного гена приведены в Приложении к этой статье (рис. 8).

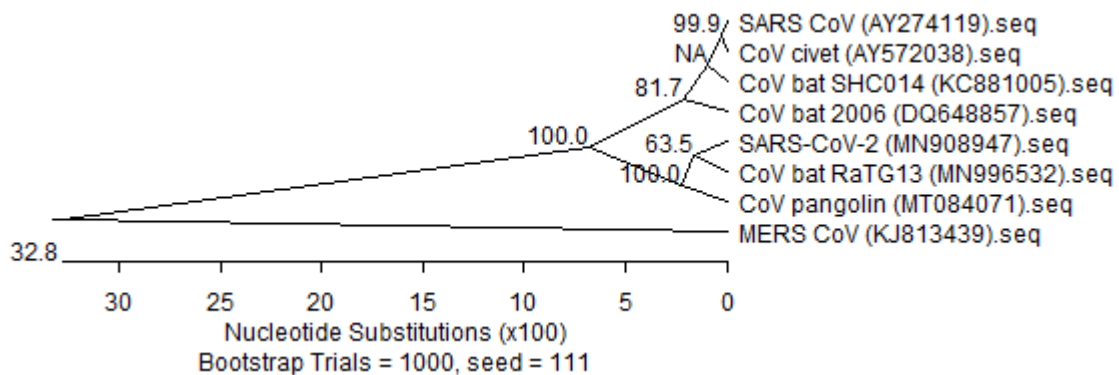


Рис. 6. Филогенетическое древо некоторых бетакоронавирусов из подрода сарбековирусов, построенное на основании сравнения генов нуклеокапсидных N белков. (Пояснения в тексте)

Fig. 6. Phylogenetic tree of some betacoronaviruses from the subgenus of sarbecoviruses, constructed on the basis of comparison of genes of nucleocapsid N proteins. (Explanations in the text)

Проведенным множественным выравниванием нуклеотидных последовательностей гена N белка показано (рис. 6), что все представители подрода сарбековирусов формируют одну общую ветвь, подразделяющуюся на два кластера, объединяющих штаммы, близкие к SARS-CoV-2, и штаммы, близкие к SARS-CoV. При этом коронавирус MERS-CoV, относящийся к другому подроду мербековирусов и сформировавший отдельную удаленную ветвь, при этом выравнивании послужил корневым видом. Приведенное в Приложении (рис. 8) сравнение нуклеотидных последовательностей гена N белка сарбековирусов (SARS-CoV-2, RaTG13, CoV панголина, CoV SHC014, SARS CoV, CoV циветы,

CoV летучей мыши) позволяет видеть их различия по всей длине данного гена, имеющего протяженность от 1299 до 1308 нуклеотидов. Совпадающие нуклеотиды на этом рисунке показаны точками, а делеции – дефисами.

Далеко не все замены нуклеотидов приводят к заменам аминокислот, показанных желтым фоном. Так, между SARS-CoV-2 и RaTG13 на нуклеотидном уровне имеются 33 замены, но они приводят к заменам только пяти аминокислот, что дает гомологию 98,8%. Между SARS-CoV-2 и SARS-CoV имеются уже 155 нуклеотидных замен, приводящих к заменам 45 аминокислот, что составляет 88,5% и 89,6% соответственно. Здесь можно заметить, что

гомология полных геномов SARS-CoV и SARS-CoV-2 заметно ниже – 79,6%, что свидетельствует о более высокой эволюционной консервативности гена N белка. Достоверно неопределенные 14 нуклеотидов для панголина обозначены как «n», и кодируемые с их участием триплеты приведены на сиреновом фоне. Потриплетное сравнение нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих N белки, разных сарбековирусов (рис. 8) позволяет наглядно

видеть, какие участки могут быть выбраны в качестве мишеней для диагностики COVID-19.

Поскольку выше неоднократно говорилось про низкую вариабельность SARS-CoV-2, то для подтверждения тех слов стоит привести филогенетическое древо некоторых изолятов, выделенных в разных странах нескольких континентов.

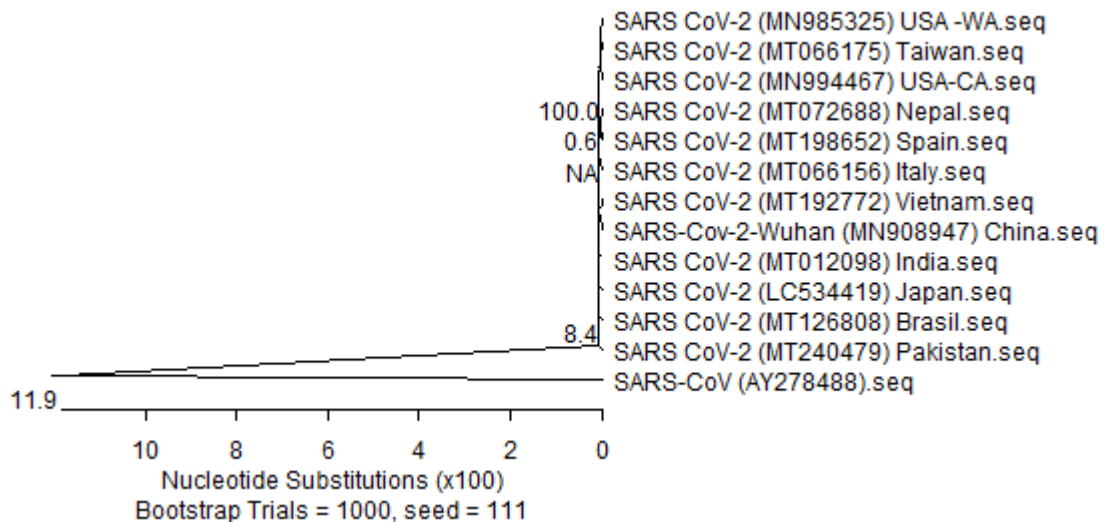


Рис. 7. Филогенетическое древо отдельных изолятов SARS-CoV-2, выделенных в разных странах, построенное по полногеномным последовательностям (Пояснение в тексте)

Fig. 7. Phylogenetic tree of individual SARS-CoV-2 isolates from different countries based on whole genome sequences (Explanation in the text)

При построении данного древа (рис. 7) была взята референсная последовательность изолята SARS-CoV-2 (Accession number MN908947) и абсолютно случайно выбранные прочие изоляты из ряда стран нескольких континентов. При этом следует заметить, что разные протяженности геномов различных изолятов обусловлены техническими сложностями прочтения концевых последовательностей, в частности, длины поли(A)-участков, чему не все авторы уделяют внимание. Как можно видеть, взятая в качестве внешней группы последовательность генома одного из изолятов коронавируса SARS-CoV образует отдельную ветвь, тогда как все изоляты SARS-CoV-2 формируют по сути единый кластер с минимальными отличиями между их геномами. Акцентируем на этом внимание, поскольку в ненаучной литературе часто пишут о быстром мутировании SARS-CoV-2, что не соответствует действительности. Что касается научных публикаций на этот счет, то можно привести обзорную статью, в которой говорится, что при репликации ДНК-вирусов количество ошибок составляет от 10^{-8} до 10^{-11} на нуклеотид. Для РНК-вирусов этот показатель гораздо

выше – от 10^{-3} до 10^{-4} замен [Holland et al., 1982]. В этой же статье дается объяснение таким различиям, вызванным отсутствием у РНК-вирусов редактирующей активности. Но при этом оговаривается, что для РНК-репликаз подобная активность еще не обнаружена. Однако, как говорилось выше, у коронавируса таковая позже была обнаружена [Minskaia et al., 2006]. Несколько иные количества мутаций у ДНК- и РНК-вирусов приводятся в другой статье – 10^{-8} – 10^{-6} на нуклеотид на инфекцию и 10^{-6} – 10^{-4} соответственно [Sanjuan et al., 2010]. В этой работе дается также ссылка на веб-ресурс, содержащий информацию о скоростях мутаций у разных вирусов (<https://www.uv.es/rsanjuan/virmut>), но, к сожалению, коронавируса там пока нет. Имеется лишь одна статья, где сообщается о скорости мутаций у SARS-CoV [Zhao et al., 2004], но авторы выбрали немного странную оценку в виде числа замен нуклеотидов на сайт в год, тогда как обычно принято выражать этот показатель не на год, а на инфекционное событие, и сколько их происходит в год у потомков одного и того же вируса, подсчитать невозможно.

Нельзя не коснуться поднимаемого вопроса об искусственном происхождении вируса SARS-CoV-2, поводом для которого послужила статья 2015 г. в журнале *Nature Medicine*, описывающая создание химерного коронавируса на основе адаптированного к белым мышам SARS-CoV (M15) с S белком из вируса SHC014-CoV летучей мыши [Menachery et al., 2015]. Эта работа была выполнена большим международным коллективом, представленным главным образом американскими специалистами из Университета Северной Каролины и некоторых других мест. Помимо них среди соавторов был один представитель Швейцарии и два из Китая - из Вирусологического института в Ухане. При этом, судя по вкладу каждого соавтора, приведенного в конце данной статьи, все генно-инженерные манипуляции были произведены в США, тогда как их китайскими коллегами предоставлены плазмиды и информация о нуклеотидных последовательностях, а также выполнены эксперименты по типированию. В укор авторам ставится то, что ими был осознанно создан опасный возбудитель, поскольку был взят вирус, характеризующийся рецептор-связывающим участком, узнающим человеческий рецептор ACE2, и была продемонстрирована способность химерного вируса заражать мышей, а также размножаться в культуре клеток человека, хотя авторы в своей статье отмечают, что их работа была направлена на предсказание новых опасных коронавирусов в будущем и для подготовки к этому событию.

Необходимо заметить, что подобные работы по восстановлению с помощью обратной генетики [Cockrell et al., 2017] полноразмерных геномов коронавирусов как SARS-CoV, так и MERS-CoV этими исследователями проводились и ранее с целью создать генетическую платформу для изучения функции генов и проектирования вакцин против этих вирусов [Yount et al., 2003; Scobey et al., 2013]. Другими авторами этим же методом был создан химерный бетакоронавирус летучей мыши, в котором рецептор-связывающий домен был заменен на аналогичный, но отличающийся рядом аминокислот, имеющий также несколько большую длину (на 17 аминокислот) и при этом взятый у «человеческого» коронавируса SARS-CoV [Becker et al., 2008]. Авторы указали, что эта их работа была проделана для возможности изучения механизмов межвидового перемещения зоонозных инфекций и для лучшей готовности реагировать на возникающие эпидемические угрозы. К слову сказать, при создании данной химерной конструкции использовались две рестрикционные эндонуклеазы с гексануклеотидными сайтами узнавания *Bst*BI и *Msc*I, по которым с помощью секвенирования можно идентифицировать запрограммированную химерность получившегося

вируса. Это к вопросу о том, можно ли отличить искусственно созданный вирус от природного. Однако более передовое так называемое «бесшовное» лигирование при объединении фрагментов ДНК позволяет не прибегать к использованию рестрикционных эндонуклеаз, и такая конструкция в месте соединения разных частей будет неотличима от природных, образующихся в результате рекомбинационных событий.

Возвращаясь к упомянутой статье 2015 г., следует отметить, что двумя группами ученых из разных стран недавно проведено сравнение нуклеотидных последовательностей нового вируса SARS-CoV-2 с SARS-CoV и с некоторыми бетакоронавирусами из дикой природы, а также с химерным SHC014-MA15 коронавирусом. Их мы кратко рассмотрим, но сначала отметим, что вышеприведенный в этом разделе данной статьи материал также свидетельствует о постоянно происходящих рекомбинационных событиях в вирусных геномах, появлении новых генотипов бетакоронавирусов и их эволюционировании.

При сопоставлении аминокислотных последовательностей рецептор-связывающего домена S белка SARS-CoV-2, SARS-CoV человека, CoV панголина, штамма RaTG13 и еще двух штаммов коронавирусов из летучих мышей было обнаружено, что шесть наиболее ключевых аминокислот полностью совпадают у SARS-CoV-2 только с панголином, тогда как SARS-CoV и RaTG13 имеют только по одной совпадающей аминокислоте из этих шести, причем разные [Andersen et al., 2020]. Это свидетельствует, что коронавирус панголина является одним из ближайших предшественников нового коронавируса, вызывающего COVID-19. Еще одним важным доказательством нелабораторного возникновения нового коронавируса является биоинформатический анализ этого участка S белка, говорящий о том, что такая последовательность аминокислот должна взаимодействовать с ACE2 рецептором человека хуже, нежели аналогичная у старого SARS-CoV, и поэтому, если бы этот участок генома создавался искусственно, то он был бы иной. Есть и другие отличия между сравниваемыми в этой статье видами и штаммами коронавирусов, подтверждающими точку зрения о природном происхождении SARS-CoV-2 [Andersen et al., 2020]. Однако касательно «слабого» взаимодействия S белка нового коронавируса с ACE2 рецептором - с этим высказыванием можно не согласиться, поскольку выше уже упоминалось, что у SARS-CoV-2 рецептор-связывающийся домен лучше взаимодействует с ACE2 рецептором человека, что установлено не только экспериментальными методами [Lan et al., 2020; Shang et al., 2020], но и анализом *in silico* [Ortega

et al., 2020], хотя можно допустить, что разные авторы использовали разное программное обеспечение, и оно дало отличающиеся результаты.

В связи с повышенным вниманием к статье, описывающей генно-инженерные эксперименты по созданию коронавируса [Menachery et al., 2015], вторая группа авторов проанализировала геномные последовательности нескольких коронавируса и пришла к заключению, что новый бетакоронавирус SARS-CoV-2 является продуктом естественного происхождения, поскольку с химерным вирусом SHC014-MA15 новый вирус имеет слишком много различий в нуклеотидных последовательностях [Lu et al., 2020]. Но это ничуть не удивительно, поскольку мажорным компонентом выступил коронавирус SARS-CoV, имеющий с SARS-CoV-2 менее 80% гомологии. Таким образом, можно уверенно констатировать, что именно та химера SHC014-MA15¹² никакого отношения к SARS-CoV-2, конечно же, не имеет, и этот новый коронавирус является все же продуктом естественных рекомбинационных процессов и отдельных мутаций, которые при преодолении межвидового барьера могут играть даже большую роль.

Однако существует и иная точка зрения на происхождение бетакоронавируса SARS-CoV-2, опирающаяся на разрозненные сведения, согласно которым, если свести их воедино, вырисовывается несколько другая картина. Считается, что новый коронавирус впервые «объявился» на рынке морепродуктов в Ухане, но хронология событий заставляет усомниться в этом. Подробное описание клинических проявлений болезни дали в конце января 2020 г. китайские авторы [Huang et al., 2020], отметившие, что из первых 41 пациента 14 человек к тому рынку не имели никакого отношения, включая самого первого, заболевшего еще 1 декабря 2019 г. С учетом длительного инкубационного периода можно допустить, что он «подхватил» заразу где-то в середине ноября. Более того, никаких эпидемиологических следов не вело от этого человека к заболевшим позже, и поэтому он не может считаться «нулевым» пациентом при распространении инфекции. В краткой заметке в журнале Science [Cohen, 2020], опубликованной в конце января и посвященной в том числе происхождению SARS-CoV-2, отмечается, что среди первой группы заболевших (41 человек) слишком высока доля тех, кто к рынку морепродуктов отношения не имел, из чего можно сделать вывод, что вирус циркулировал по Уханю некоторое время и

только потом попал на рынок. В этой заметке также упоминается о том, что, согласно некоторым сообщениям, данная инфекция началась еще 18 сентября 2019 г.

Есть немало конспирологических гипотез и наблюдений за развитием событий вокруг нового бетакоронавируса и вызываемой им болезни (начиная с событий еще летних месяцев 2019 г.), но поскольку они не опубликованы в рецензируемых изданиях, мы воздержимся от комментариев на этот счет.

Детекция бетакоронавирусов с помощью ПЦР

Быстрое распространение по всему миру SARS-CoV-2 заставило исследователей различных стран направить свои усилия на разработку быстрых и при этом точных лабораторных методов диагностики данного возбудителя. И к настоящему времени за весьма короткий срок ряд тест-систем уже создан. Но прежде чем перейти к их рассмотрению, стоит уделить внимание тому, как развивалась ПЦР детекция бетакоронавирусных инфекций у человека, начиная с SARS-CoV. При этом во внимание будут приниматься только пионерские работы, а также статьи методического плана. Начать нужно с детекции одновременно многих коронавируса с помощью так называемого панкоронавирусного теста, тем более, что в одной из первых работ по выявлению SARS-CoV-2 на ранней стадии как раз использовались панкоронавирусные праймеры [Zhu et al., 2020].

Поскольку коронавирусы имеют РНК-геном, то вся проводимая ПЦР для их детекции является обратнo-транскрипционной ПЦР (ОТ-ПЦР), в которой на первом этапе проводится преобразование цепей РНК в их ДНК-копию под действием подходящей обратной транскриптазы (или иначе ревертазы). Поэтому, если в дальнейшем изложении при рассмотрении детекции коронавируса с помощью ПЦР где-то будет отсутствовать упоминание про обратную транскрипцию, то это не означает, что в описываемом методе экспериментаторы обошлись без нее.

С помощью довольно сильно вырожденных праймеров в ОТ-ПЦР в режиме реального времени одновременно удалось детектировать альфа- и бетакоронавирусы HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43, а также SARS-CoV [Escutenaire et al., 2007; Vjgen et al., 2008]. Вырожденные праймеры, подобранные к наиболее консервативным участкам геномов, кодирующим RdRp торовирусов ToV и коронавируса CoV, позволили применять их для работы с клиническими образцами [Zlateva et al., 2011]. Группу коронавируса составили 229E, HKU1, NL63 и OC43. В своей следующей работе эти авторы, используя подобранные праймеры, исследовали 1800 образцов из носоглотки у больных с респираторными

¹² Впрочем, создать новые химеры, умеючи и обретая опыт, довольно легко и таких уже, как даже видно из данной статьи, создано по миру немало.

инфекциями, у которых были обнаружены указанные выше коронавирусы. Другие коронавирусы при этом не выявились [Zlateva et al., 2013].

На основе праймеров, специфичных для каждого из шести известных коронавирусов человека, были созданы две мультиплексные системы (Multiplex 1 - HCoV-NL63, HCoV-229E, SARS-CoV; Multiplex 2 – HCoV-OC43, MERS-CoV, HCoV-HKU1), позволяющие с помощью ПЦР с TaqMan зондами анализировать в режиме реального времени различные образцы одновременно на все эти инфекции [Niu et al., 2016]. Относительно недавно появилась статья, где говорится, что с помощью ПЦР с вырожденными праймерами были детектированы одновременно α -, β -, γ - и δ -коронавирусы, но их поиск велся только у животных объектов [Hu et al., 2018].

Поскольку от момента определения полных нуклеотидных последовательностей ряда изолятов SARS-CoV, ставших известными на рубеже апрель-мая 2003 г., до исчезновения этой инфекции в июле того же года прошло очень мало времени, то практически все статьи по использованию ПЦР для диагностики SARS-CoV вышли уже позже. Тем не менее, можно упомянуть одну из первых работ, вышедшую в середине апреля 2003 г., в которой исследовались 50 пациентов на предмет наличия у них SARS-CoV с помощью вложенной обратнотранскрипционной ПЦР с вырожденными праймерами [Peiris et al., 2003]. В этой же работе для построения кДНК использовался 26-ти звенный вырожденный праймер, несущий на 3'-конце подряд шесть N. В том же 2003 году (но уже после завершения эпидемии ТОРС) были опубликованы еще несколько статей, посвященных методическим вопросам детекции с помощью обычной ОТ-ПЦР по конечной точке или ПЦР в режиме реального времени изолятов SARS-CoV [Lau et al., 2003; Poon et al., 2003; Wu et al., 2003; Yam et al., 2003; Zhang et al., 2003]. В аналогичных публикациях 2004 – 2005 гг. упор в диагностике SARS-CoV был сделан на использовании ОТ-ПЦР в реальном времени [Chen et al., 2004; Poon et al., 2004; 2004a; Wu et al., 2004; Chui et al., 2005; Hu et al., 2005; Huang et al., 2005]. В одной из статей сообщалось о проведении для детекции SARS-CoV мультиплексной (триплексной) ПЦР с рекомендованными ВОЗ праймерными системами, продемонстрировавшей успешное накопление специфичных продуктов с ожидаемыми размерами 121, 182 и 302 п.н. [Chen et al., 2004]. В ряде работ для детекции результатов ПЦР амплификации и детекции SARS-CoV применялся ДНК-чиповый вариант [Shi et al., 2003; Juang et al., 2004].

Затем последовал значительный перерыв в интересе к этому объекту, и лишь летом 2012 г.,

незадолго до второго пришествия опасных бетакоронавирусов, была опубликована статья, посвященная детекции с помощью ПЦР в реальном времени четырех non-SARS коронавирусов человека (HCoVs – 229E, OC43, HKU1, NL63), причем для каждого возбудителя применялся свой комплект праймеров и соответствующий гибридизационный зонд [Lu et al., 2012].

Осенью 2012 г. вскоре после появления нового ближневосточного коронавируса MERS-CoV международным коллективом авторов была предложена его детекция с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени [Corman et al., 2012]. Мишенями послужили участок, предшествующий гену E (upE), и фрагмент открытой рамки считывания ORF1b. Было показано, что эта реакция специфична и перекрестная реактивность с другими коронавирусами OC43, NL63, 229E, SARS-CoV отсутствует. Позже этой же группой авторов данный тест на новый коронавирус был доработан путем добавления еще двух участков, расположенных в гене N и гене RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) [Corman et al., 2012a]. Затем на основе upE и ORF1a мишеней¹³ ими же была улучшена детекция MERS-CoV, позволяющая улавливать с помощью ПЦР в реальном времени 5 - 9 копий данного коронавируса в реакции [Corman et al., 2014a], легшая в основу специального набора RealStar MERS-CoV RT-PCR kit 1.0. Недавно сообщено о еще одной успешной верификации данного набора [Necht et al., 2019]. Было проведено международное исследование эффективности выбранных мишеней для диагностики MERS-CoV, для чего по расположенным на шести континентах 99 лабораториям была разослана панель из образцов, содержащих как MERS-CoV, так и обычные коронавирусы (NL63, OC43, 229E, HKU1), показавшее, что мишень ORF1b менее чувствительна [Pas et al., 2015]. Ранее другие авторы дополнили детекцию MERS-CoV с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени новыми праймерами и зондами на иные участки генома, показав при этом, что возможно детектировать 10 копий вируса в реакции [Lu et al., 2014].

С целью повышения специфичности детекции MERS-CoV было предложено использовать некое подобие «горячего старта», путем блокирования работы ревертазы M-MuLV с помощью

¹³ В 2013 г. мишень upE для скринингового теста для детекции MERS-CoV была предложена ВОЗ. В случае положительного результата рекомендовался дополнительный контрольный тест с ORF1a и ORF1b мишенями (https://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/mers-laboratory-testing/en/).

олигонуклеотидного аптамера, «освобождающего» этот фермент при 55°C [Rutschke et al., 2015]. Дальнейшие улучшения детекции MERS-CoV с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени заключались в использовании TaqMan системы с MGB (Minor Groove Binding) [Douglas et al., 2015] и гибридизационных проб с LNA нуклеотидами [Chan et al., 2015]. Также для увеличения специфичности ПЦР при диагностике MERS-CoV было предложено использовать систему AEGIS (Artificially Expanded Genetic Information Systems) [Glushakova et al., 2015; Yaren et al., 2016]. В одной из работ, посвященных использованию рекомендованных ВОЗ мишеней для детекции MERS-CoV, было сообщено, что в качестве положительного контроля применялась синтезированная *in vitro* РНК, соответствующая амплифицированным участкам *upE* и ORF1b [Hashemzadeh et al., 2016]. Причем авторы преподносят этот момент как «инаугурацию» такого контроля, поскольку ранее для этой цели преимущественно использовались молекулы ДНК в виде плазмид, несущих нужные участки. Однако надо заметить, что еще в упоминаемой выше статье Corman и соавт. [2012] в разделе «Материалы и методы» есть конкретный абзац, описывающий приготовление для положительного контроля транскрибируемой *in vitro* РНК. Недавно сообщено об ультрабыстрой детекции MERS-CoV с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени, занявшей всего 30 мин и проводившейся в мобильном ДНК-термоциклере [Shirato et al., 2019].

Поскольку MERS-CoV в отличие от SARS-CoV не исчез, то для него было разработано немало диагностических тестов. Так, в одной из работ сравнивались шесть коммерческих наборов производства разных фирм для детекции с помощью ПЦР в реальном времени MERS-CoV [Kim et al., 2016]. Все проанализированные наборы (PowerChek MERS-CoV, DiaPlexQ MERS-CoV, Anyplex II MERS-CoV, AccuPower MERS-CoV, LightMix Molecular Dx kit MERS-CoV, UltraFast LabChip MERS-CoV) показали высокую специфичность и должную чувствительность для детекции возбудителя этой инфекции, причем требовавшееся время варьировало от 30 мин до более чем двух часов. В частности, отдельное исследование набора PowerChek MERS, мишенями в котором служат *upE* и ORF1a, при анализе 100 образцов (50 больных и 50 здоровых) показало его 100% специфичность [Huh et al., 2017]. Еще один коммерческий набор GeneSig для детекции MERS-CoV, также показавший хорошие результаты, испытывали другие авторы [Hoteit et al., 2016]. Различные наборы, рассчитанные на детекцию в ПЦР в реальном времени MERS-CoV, после испытаний были ранжированы по их специфичности, причем

проводился этот анализ с использованием разных ДНК-термоциклеров [Mohamed et al., 2017].

Вскоре после того как стала известна полная нуклеотидная последовательность генома бетакоронавируса SARS-CoV-2, международной группой ученых (Германия, Нидерланды, Китай, Франция, Англия, Бельгия) в редакцию журнала Euro Surveill 21 января 2020 г. была направлена статья, описывающая метод детекции этого вируса с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени [Corman et al., 2020]. 22 января статья была принята к печати и 23 января опубликована on-line. В этой работе были разработаны комплекты праймеров и гибридизационных зондов к ним для трех мишеней – гена белка N, гена белка E и гена RdRp, причем для последнего были предложены два гибридизационных зонда, один из которых был специфичен только для нового SARS-CoV-2 вируса, а второй, названный Pan-Sarbeco-Probe – для различных коронавирусов из подрода *Sarbecovirus*, причем часть из этих праймеров и зондов несла немногочисленные вырожденные нуклеотиды. 24 января 2020 г. также on-line была опубликована уже упоминавшаяся статья китайских авторов [Zhu et al., 2020], в которой в разделе Supplement были предложены тест-системы для детекции SARS-CoV-2 на основе ОТ-ПЦР в реальном времени с двумя наборами праймеров и флуоресцентных проб, выявляющих ген нуклеокапсидного белка N и открытую рамку считывания ORF1ab. Также 24 января 2020 г. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) в США предложил для детекции SARS-CoV-2 с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени использовать свою панель праймеров и гибридизационных зондов, которая включала три разных участка в гене N и один в гене RP (RNase-P) (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>). Иной комплект праймеров и зондов для детекции с помощью ПЦР в реальном времени ORF1b и гена N бетакоронавируса SARS-CoV-2 предложен другой группой авторов [Chu et al., 2020]. Об улучшенной молекулярной диагностике на основе ПЦР в реальном времени с использованием трех новых мишеней в виде гена геликазы, гена белка S и гена белка N, позволяющей детектировать 11,2 копии РНК вируса на реакцию, сообщается в другой статье [Chan et al., 2020]. На основе комплекта праймеров и гибридизационного зонда к гену белка N [Corman et al., 2020] для детекции SARS-CoV-2 была протестирована высокопроизводительная система амплификации нуклеиновых кислот cobas 6800 фирмы Roche, показавшая свою пригодность для массовых анализов [Pfefferle et al., 2020].

Описан способ детекции SARS-CoV-2 с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR

Green I [Yip et al., 2020]. При этом с помощью специальной компьютерной программы GolayMetaMiner было проанализировано 96 геномов, принадлежащих SARS-CoV-2, и еще 104 non-SARS-CoV-2 генома, что позволило обнаружить во всем геноме только четыре уникальных участка протяженностью от 58 до 154 нуклеотидов. Для одного из них (в гене *nsp2*) были подобраны праймеры, обеспечившие высокую чувствительность и точность амплификации целевого ампликона для различных клинических образцов.

Поскольку при излечении важно контролировать процесс изменения количества вирусных частиц у пациента, то в этом случае более достоверные результаты может дать цифровая ПЦР, и такая для SARS-CoV-2 уже предложена [Yu et al., 2020]. В этой работе амплификация проводилась в приборе TargetingOne Digital PCR System (TargetingOne, Китай) с набором COVID-19 digital PCR detection kit. Здесь также можно заметить, что французская фирма Stilla Technologies стала выпускать специальный набор для цифровой ПЦР «A 3-color Crystal Digital PCR kit for detection of COVID-19» (<https://www.stillatechnologies.com/a-3-color-crystal-digital-pcr-kit-for-detection-of-covid-19/>) для производимого ими прибора Crystal Digital PCR™ The Naica™ System Workflow.

В целом ряде статей, подготовленных по итогам исследований во время эпидемии SARS-CoV-2 в Китае в первые месяцы 2020 г., говорится о низкой эффективности ПЦР-тестов на этот коронавирус. Так, сообщается, что только 57% образцов дали положительные результаты при исследовании 4880 пациентов, имеющих клинические проявления инфекции [Liu et al., 2020]. В одной из работ использовали три разных набора китайского производства для детекции SARS-CoV-2 с помощью ПЦР в реальном времени (GeneDx, Maccusa, LifeRiver), но эффективность детекции составила лишь 47% [Xie et al., 2020]. Другие авторы также сообщают о большом количестве ложно-негативных результатов в ПЦР при анализе больных COVID-19 [Hao, Li, 2020; Li et al., 2020; 2020a]. Во многих работах подчеркивается, что точность диагностики с помощью ПЦР заметно уступает таковой, проводимой путем компьютерной томографии [Ai et al., 2020; Fang et al., 2020; Long et al., 2020; Tao et al., 2020]. Безусловно, диагностика на основе амплификации нуклеиновых кислот (не только ПЦР) имеет свои преимущества по массовости, скорости, дешевизне. При этом складывается общее впечатление, что чувствительности ПЦР зачастую не хватает, и нужны реакции с увеличенным коэффициентом размножения специфических (детектируемых) фрагментов.

Детекция бетакоронавирусов с помощью прочих методов амплификации

Нет сомнений, что ПЦР в силу множества причин, по крайней мере, пока,¹⁴ представляет собой метод молекулярной диагностики №1 во всем мире, однако помимо этой реакции существуют иные методы высокочувствительной детекции нуклеиновых кислот. Так, пожалуй, сейчас вторым по масштабам применения (хотя и с огромным отрывом) является петлевая амплификация (LAMP – Loop AMPlification) [Notomi et al., 2000]. Ее главным преимуществом является изотермический характер, не требующий использования дорогостоящих ДНК-термоциклеров. Следует заметить, что все изотермические реакции амплификации нуклеиновых кислот искусственно не сдерживаются сменой температур, требующимися для ПЦР, и все время идут с максимально возможной в тот момент для используемого(ых) фермента(ов) скоростью, что обеспечивает их быстроту. Другое преимущество заключается в увеличенной специфичности этой реакции (LAMP) ввиду того, что необходимым условием ее успешного протекания является отжиг как минимум четырех праймеров, два из которых несут к тому же двойные места отжига. Однако такое увеличенное количество праймеров и их большая длина одновременно является и некоторым недостатком этого метода. Но важнее – другое. Так, в ряде случаев довольно критичным параметром является расстояние между отжигающимися (крайними) праймерами, и если оно велико, то существует вероятность, что в анализируемом образце в силу разных причин молекул нуклеиновых кислот такого размера (это больше касается РНК) может и не оказаться, что приведет к ложно-негативному результату. Причем для проведения петлевой амплификации требуется присутствие в анализируемом образце фрагментов ДНК или РНК с минимальным размером около 200 нуклеотидов (с учетом обычной используемой дополнительной пары праймеров), что не так уж и мало. В то же время для проведения ПЦР достаточно наличия фрагментов ДНК или РНК размером всего около 40 нуклеотидов [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2015; Garafutdinov et al., 2017]. При этом считается, что петлевые амплификации (LAMP, SmartAmp) по крайней мере, на порядок чувствительнее ПЦР. К тому же в определенных вариантах возможна даже

¹⁴ Нельзя исключать, что в сложившейся ситуации изотермический метод детекции специфичных фрагментов нуклеиновых кислот, такой как петлевая амплификация, может потеснить ПЦР, поскольку к этой реакции уже привыкнут и проще будет перейти на нее при диагностике других инфекций.

просто визуальная оценка произошедшей амплификации.

Учитывая ряд вышеописанных преимуществ, LAMP не могла быть не использована для детекции бетакоронавирусов. Так, японская фирма Eiken Chemical Co еще в 2003 г. выпустила специальный набор Loopamp SARS Coronavirus Detection Reagent kit для обнаружения SARS-CoV. Его чувствительность составила 10 копий РНК вируса в реакции, время которой составило 45 минут. С использованием этого набора была подготовлена экспериментальная статья по детекции SARS-CoV [Poon et al., 2005]. После появления бетакоронавируса MERS-CoV его детекция также стала проводиться с помощью петлевой амплификации [Shirato et al., 2014; Huang et al., 2018]. Сейчас, когда свирепствует новый бетакоронавирус SARS-CoV-2, в очередной раз обратились к методу LAMP, и уже множеством фирм производятся соответствующие наборы, о которых будет говориться в другом разделе данной статьи. Здесь же коснемся лишь экспериментальных статей самого последнего времени, описывающих применение петлевой амплификации LAMP для детекции SARS-CoV-2. Так, недавно проведено сравнение методов ПЦР и LAMP для выявления COVID-19 и при этом показано, что последний метод имеет немало преимуществ [Nguyen et al., 2020]. Другими авторами также сравнивалась ПЦР с петлевой амплификацией, которая оказалась значительно чувствительнее, чем ПЦР [Lamb et al., 2020]. В одной из работ визуально наблюдавшееся изменение окраски реакционной смеси при амплификации с помощью LAMP свидетельствовало о наличии в анализируемом образце вирусного материала SARS-CoV-2 [Zhang et al., 2020a]. Возможное применение LAMP для визуальной детекции SARS-CoV-2 при анализах по месту лечения или ПОСТ-анализах (Point-of-Care-Testing) на основе комплекта праймеров к RdRp мишени описано другими авторами [Lu et al., 2020]. Еще один способ колориметрической детекции результатов LAMP за счет изменения окраски добавленного в реакционную смесь рН индикатора - фенолового красного был применен для обнаружения SARS-CoV-2, в качестве амплифицируемого участка которого был выбран фрагмент гена нуклеокапсидного белка [Baek et al., 2020]. Время реакции составило от 30 до 60 минут, а чувствительность детекции – 10^2 мишеней. Объединение двух реакций – RPA (Recombinase Polymerase Amplification) и LAMP, получившее обозначение Penn-RAMP, еще больше увеличило чувствительность такой диагностики, что позволило успешно детектировать SARS-CoV-2 [El-Tholoth et al., 2020]. Поскольку RPA в данной статье будет еще не раз упоминаться, то имеет смысл коротко

охарактеризовать эту реакцию. Помимо изотермичности ее протекания (37 - 42°C), она имеет еще ряд особенностей. Так, в ней как такового отжига праймеров не происходит, а работает целый комплекс ферментов, способствующих вытеснению одной из цепей и гибридизации с другой цепью олигонуклеотидов, используемых в качестве праймеров, и поэтому их предпочтительная длина должна быть около 30 нуклеотидов. Используемая ДНК полимеразы (обычно *Bsu*) должна иметь цепь-вытесняющую активность, что приводит к образованию новых одноцепочечных матриц для их дальнейшего вовлечения в процесс амплификации.

Еще одной применяемой в коммерческих целях реакцией амплификации, долгое время «занимавшей» второе место после ПЦР, является так называемая NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification).¹⁵ Особенностью этой реакции является то, что исходными матрицами для нее служат молекулы РНК, и как такового отдельного этапа превращения их в кДНК не требуется, поскольку это происходит постоянно во время всего процесса амплификации. Поскольку коронавирусы имеют РНК-геном, то вполне логично было использовать NASBA для их обнаружения, что и имело место еще для SARS-CoV в количественном варианте с детекцией в режиме реального времени [Chantralita et al., 2004; Keightley et al., 2005]. Причем в этих работах проводилось сравнение с ПЦР и было отмечено, что с помощью NASBA удалось выявлять 1 копию вируса в реакции, тогда как ПЦР обеспечивала обнаружение лишь 10 копий.

Детекция SARS-CoV осуществлялась с помощью еще одной изотермической реакции амплификации нуклеиновых кислот – RCA (Rolling

¹⁵ Невозможно удержаться от того, чтобы не заметить, что NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) [Compton, 1991] - совершенно неправильное название, абсолютно не отражающее суть данного метода, поскольку все реакции амплификации нуклеиновых кислот так или иначе основаны на нуклеотидных последовательностях, точнее их специфичности или уникальности. При этом первоначальным названием этого метода было 3SR (Self-Sustained Sequence Replication) [Guatelli et al., 1990], а его предшественник назывался TAS (Transcription-based Amplification System) [Kwoh et al., 1989]. Однако для данной реакции, которую можно также назвать «транскрипционной цепной реакцией» (ТЦР), что было бы вполне справедливо и соответствовало происходящим процессам, «прижилось», как ни странно, именно обозначение NASBA.

Circle Amplification), причем отмечалось, что этот подход имеет ряд преимуществ перед обычной ПЦР [Wang et al., 2005]. Другой перспективной изотермической реакцией амплификации нуклеиновых кислот служит уже упоминавшаяся RPA, которая также нашла применение для детекции MERS-CoV [Abd El Wahed et al., 2013]. В одной из статей для детекции MERS-CoV описывается применение так называемой iPCR (insulated isothermal PCR) [Go et al., 2017]. Строго говоря, iPCR изотермической реакцией является лишь постольку, поскольку прилагаемые к внешней поверхности реакционного сосуда в соответствующих местах источники высокой и низкой температуры остаются неизменными, а за счет возникающих конвективных токов жидкости внутри этих сосудов происходит перемещение раствора между зонами с разными температурами, и таким образом происходит обычная ПЦР амплификация, что довольно подробно рассмотрено нами в специальном обзоре, целиком посвященном конвекционной ПЦР [Чемерис и др. (Chemeris et.), 2018].

Хотя главное предназначение CRISPR/Cas технологии заключается в проведении геномного редактирования, тем не менее, отдельные компоненты этих систем находят применение и в других областях, с ним не связанных, что рассмотрено в одной из наших статей [Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2017], подготовленной для тематического номера журнала Биомика, посвященного CRISPR/Cas системам [Чемерис (Chemeris), 2017]. Так, с использованием CRISPR/Cas технологии недавно разработана высокоспецифичная и высокочувствительная CRISPR-nCoV система детекции нового коронавируса SARS-CoV-2 [Hou et al., 2020]. В ее основе лежит упоминаемая выше RPA амплификация, сопровождаемая транскрипцией полученных ампликонов, несущих в составе одного из праймеров на 5'-конце экстрапоследовательность нуклеотидов, соответствующую фаговому промотору T7, с помощью которого T7 РНК полимеразы нарабатывает множество копий молекул РНК, после чего в дело вступает нацеленная на разрушение молекул РНК Cas13a нуклеаза, формирующая со специальной sgРНК рибонуклеопротеидный комплекс, причем данная sgРНК несет гидовую последовательность, узнающую выбранную мишень на бетакоронавирусной РНК. При этом в растворе присутствует еще специальный репортерный рибоолигонуклеотид. Нуклеаза Cas13a после активации фермента специфичной РНК, соответствующей участку-мишени SARS-CoV, за счет своей коллатеральной активности расщепляет уже неспецифически все присутствующие в реакционной смеси молекулы РНК, а так как специально

добавленные репортерные молекулы РНК несут флуорохром и тушител, то после физического разобщения последних вследствие разрушения всех подряд молекул РНК флуоресцентный краситель начинает светиться, что и детектируется с помощью соответствующих устройств. Чувствительность данного теста находится на уровне единичных молекул вируса, а время, затрачиваемое на всю детекцию, составляет 40 минут, из которых 30 минут уходит на RPA амплификацию, а 10 минут - на CRISPR детекцию.

Другими авторами была разработана своя система детекции SARS-CoV-2 также на основе CRISPR/Cas технологии, названная как All-In-One-Dual CRISPR-Cas12a (AIOD-CRISPR) [Ding et al., 2020]. В ней так же, как и в описанном выше подходе, на первой стадии применяется RPA амплификация с той лишь разницей, что далее используется Cas12a нуклеаза, которая разрушает ДНК, и поэтому не требуется использовать праймер с T7 промотором, а в качестве репортерных молекул служат подобные олигонуклеотиды с дезоксирибозой, несущие соответствующие флуорохром и тушител флуоресценции.

Подобная же работа по детекции SARS-CoV-2 с помощью CRISPR/Cas технологии с нуклеазой Cas12 была выполнена международным коллективом. Ее отличием являлось то, что детекция результатов амплификации осуществлялась двумя методами – регистрацией флуоресценции или тонкослойной хроматографией на бумаге [Curi et al., 2020]. Описан метод детекции SARS-CoV-2 с использованием Cas12 нуклеазы с использованием тонкослойной хроматографии, получивший название SARS-CoV-2 DETECTR test. При этом на первой стадии для наработки продуктов ампликации применяли технологию LAMP [Broughton et al., 2020]. Данный тест завершается менее чем за 40 минут, из которых в первые 20-30 минут проводится петлевая амплификация, после чего 10 мин необходимо для Cas12 нуклеазы и разрушения репортерных олигонуклеотидов. Дополнительно две минуты затрачивается на хроматографию. Анализ нескольких десятков образцов, как здоровых, так и больных людей с помощью SARS-CoV-2-DETECTR test продемонстрировал высокую чувствительность и специфичность: 95% для положительных результатов и 100% - для отрицательных. Отмечается, что сравнение ОТ-ПЦР с SARS-CoV-2 DETECTR test позволяет надеяться на то, что последний при сходной чувствительности будет иметь некоторое преимущество по времени и простоте используемого оборудования, но невозможен в количественном варианте.

Наконец, еще одним способом детекции наличия в человеке вирусной РНК SARS-CoV-2 является полногеномное (по сути, метагеномное) секвенирование, примененное в одной из работ [Hou et al., 2020]. Этот подход получил название mNGS Assay for 2019-nCoV. Несмотря на свою крайне высокую чувствительность, этот метод очень дорогостоящ и весьма длителен, поскольку, по подсчетам авторов, занимает около 20 часов, из которых 8 часов уходит на пробоподготовку, 10 часов на флуоресцентное секвенирование в приборе фирмы Illumina и 2 часа на биоинформатический анализ, который должен удалить все нуклеотидные последовательности, не принадлежащие коронавирусу. Схожая работа по детекции SARS-CoV-2 у двух пациентов с помощью mNGS была выполнена также и другими авторами [Chen et al., 2020].

Массовая детекция SARS-CoV-2 с помощью разных диагностических тест-систем, в том числе отечественных

Помимо уже упоминавшихся выше диагностических наборов для детекции SARS-CoV-2, в том числе зарекомендовавших себя не с лучшей стороны, имеется масса других, включая разработанные и изготовленные в нашей стране. Часть из них основана на ОТ-ПЦР в режиме реального времени, тогда как некоторые используют петлевую амплификацию. Но сначала коротко коснемся того, что в этом направлении делается в мире.

На международном ресурсе FIND, ставящим задачу сделать медицинскую диагностику лучше, создан специальный раздел SARS-COV-2 Diagnostic Pipeline, посвященный COVID-19 (<https://www.finddx.org/covid-19/pipeline/>) и содержащий на начало апреля 2020 г. информацию о 243 тестах на SARS-CoV-2, доступных на рынке или только находящихся в разработке для диагностики COVID-19. Создатели сайта при этом не гарантируют, что представленный внушительный список является полностью исчерпывающим, поскольку сведения о своих наборах вносят сами производители, кто пожелает. На этом сайте приводится специальная форма (https://www.finddx.org/wp-content/uploads/2020/03/FIND-SARS-Form_final.pdf), которую необходимо заполнить и послать по электронной почте, чтобы конкретный набор того или иного производителя был включен в этот список. Поэтому приведенная на данном web-ресурсе информация дополнительно командой FIND не проверяется. То, что список неполный, можно видеть хотя бы по тому, что в нем нет ни одного российского набора, которых уже немало. Также отсутствует,

например, информация от уже упоминавшейся фирмы Eiken Chemical Co, готовящей к выпуску набор для диагностики SARS-CoV-2, рассчитанный на петлевую LAMP амплификацию. Нет на этом ресурсе также сведений о рассчитанном на LAMP амплификацию наборе LAMP COVID-19 фирмы OptiGene. Фирма Abbott Molecular, Inc. приводит сведения только о своем наборе для ПЦР, при этом о готовящемся к выпуску наборе ID NOW COVID-19 test на основе петлевой амплификации, обеспечивающем детекцию вируса при появлении аналитического сигнала в течение 5 минут или его отсутствие при появлении или непоявлении сигнала через 13 минут, эта фирма на данном сайте также пока не сообщила. Нет на сайте информации об упомянутой выше новой тест-системе SARS-CoV-2 DETECTR, основанной на петлевой амплификации вкпе с Cas12 нуклеазой, на которую фирма Mammoth Biosciences, Inc. намерена получить разрешение от Food and Drug Administration – организации по контролю за качеством продуктов и медикаментов в США. Тем не менее, определенную информацию о ситуации по диагностике SARS-CoV-2 в мире из этого ресурса получить можно. В частности, на нем представлена информация о наборах для цифровой ПЦР для детекции SARS-CoV-2, упоминаемых выше фирм TargetingOne и Stilla Technologies. Более десятка диагностических тестов SARS-CoV-2, разработанных в ряде стран, сопровождаемых краткими характеристиками, представлены в одной из статей в виде таблицы [Sheridan, 2020]. Почти все они основаны на ПЦР в реальном времени, за исключением одного теста, проведение которого требует 36 часов, поскольку он основан на метагеномном секвенировании.

Перечень зарегистрированных тест-систем для выявления коронавирусной инфекции в Российской Федерации приведен на сайте Российского союза промышленников и предпринимателей – <http://rspp.ru/events/news/perechen-zaregistrirrovannykh-test-sistem-dlya-vyyavleniya-koronavirusnoy-infektsii/>. Первый тест на SARS-CoV-2 «Вектор-ПЦРrv-2019nCoV-RG» в нашей стране был зарегистрирован ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора еще 11 февраля 2020 г. Ими же 14 февраля был зарегистрирован другой тест – «Вектор-OneStepПЦР-CoV-RG». 3 марта 2020 г. набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции «АмплиТест SARS-CoV-2» был зарегистрирован ФГБУ «ЦСП» Минздрава России. 25 марта 2020 г. регистрационное удостоверение на медицинское изделие выдано ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии на тест-систему «АмплиСенс® CoVs-Bat-FL». 27 марта 2020 г. регистрационные удостоверения на медицинские изделия были выданы двум разработчикам: фирме ООО «НПФ Литех» на

тест-систему «Поливив SARS-CoV-2», имеющую два варианта – стандартный (Base) и ускоренный (Express) и АО «Вектор-Бест» на «Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени «РеалБест РНК SARS-CoV-2»». 1 апреля 2020 г. Регистрационное удостоверение на медицинское изделие «Набор реагентов для выявления РНК коронавирусов SARS-CoV-2 и подобных SARS-CoV методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «SARS-CoV-2/SARS-CoV» получила компания ООО «ДНК-Технология ТС». 3 апреля 2020 г. регистрационное удостоверение на медицинское изделие – «Набор реагентов для выявления РНК коронавируса 2019-nCoV методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ-2019-nCov)» было выдано 48 Центральному НИИ Министерства обороны Российской Федерации. Этот набор реагентов был разработан совместно с компанией «Синтол». 7 апреля 2020 г. регистрационное удостоверение на «Набор реагентов для выявления РНК коронавирусов, вызывающих тяжелую респираторную инфекцию: MERS-Cov (Middle East respiratory syndrome coronavirus) и SARS-Cov (Severe acute respiratory syndrome coronavirus), в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® Cov-Bat-FL» получил Центральный НИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Все эти тест-системы рассчитаны на проведение обратно-транскрипционной ПЦР в реальном времени, продолжительность анализа составляет от полутора до трех часов.

Помимо этих наборов в России для диагностики SARS-CoV-2 имеются и другие системы, эксплуатирующие более быстрые по времени протекания (от 30 до 40 минут) вариации метода изотермической петлевой амплификации. Так, 20 марта 2020 г. компании ООО «СМАРТЛАЙФКЕА» было выдано регистрационное удостоверение на «Набор для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 в биологическом материале методом изотермической амплификации в режиме реального времени», в основе которого лежит SmartAmp технология [Mitani et al., 2007]. 2 апреля 2020 г. был зарегистрирован «Набор реагентов для выявления РНК SARS-CoV-2 методом петлевой изотермальной амплификации «Изотерм SARS-CoV-2 РНК-скрин», работающий также по принципу петлевой амплификации, но по технологии LAMP [Notomi et al., 2000]. Разработчики набора ООО «Медико-биологический союз» и АО «Генериум».

С учетом востребованности выявления коронавиральной инфекции нельзя исключать, что в

нашей стране будут и дальше появляться новые тест-системы для диагностики SARS-CoV-2 с еще лучшими характеристиками как от упомянутых производителей, так и от других, в том числе основанные на иных принципах амплификации нуклеиновых кислот.

При общем впечатляющем многообразии зарегистрированных к настоящему времени в России наборов реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 необходимо обратить внимание на ряд существенных моментов, важных для объяснения настороженности, связанной с проблемой так называемых «пропущенных» по COVID-19 пациентов. К сожалению, подобная ситуация характерна не только для России, но и для остальных стран, переживших либо переживающих в настоящее время пандемию. Причина заключается в том, что получение надежного результата исследования с помощью молекулярно-генетических методов – ОТ-ПЦР в реальном времени или, в особенности, изотермических методов амплификации требует постановки контрольных реакций, которые позволяют избежать ложноотрицательных результатов исследования. Так, после лизиса клеток исследуемого биологического образца и до этапа выделения нуклеиновых кислот в анализируемые образцы обязательно необходимо вносить контрольную РНК. После прохождения всех этапов, включая финальную амплификацию, отсутствие сигнала, отвечающего за наличие в реакционной смеси данной контрольной РНК в совокупности с отсутствием сигнала, указывающего на наличие коронавиральной РНК, означает ложноотрицательный результат, связанный с потерей анализируемого материала (искомой мишени) на этапе выделения, либо ингибирования реакций обратной транскрипции и/или амплификации. Если же сигнал амплификации по контрольной РНК получен, а по РНК коронавируса – нет, это достоверно значит, что исследованный образец является отрицательным по содержанию в нем РНК коронавируса SARS-CoV-2. Но, даже в этом случае нельзя на 100% исключить, что пациент, у которого был произведен забор биологического материала, не инфицирован COVID-19. Дело в том, что важнейшими этапами, предшествующими исследованию молекулярно-генетическими методами, являются: взятие биологического материала, его транспортировка до лаборатории, а в ряде случаев и пробоподготовка (например, если биологическим материалом является мокрота). На каждом из этих предварительных этапов также может произойти потеря РНК коронавируса. Ложноположительные результаты исследования обязательно должны контролироваться с помощью постановки в каждом эксперименте отрицательных контролей, которые

необходимо добавлять как на этапе выделения, так и на этапе амплификации.

SARS-CoV-2 и окружающая среда

Отдельный интерес представляет выяснение распространения SARS-CoV-2 в окружающей среде, включая воздушную среду, сточные воды и поверхности, а также «живучесть» этого коронавируса в различном окружении. Причем этот интерес двоякий, поскольку, с одной стороны, требуется информация о продолжительности пребывания вирионов в инфекционной форме на различных необработанных антисептиками предметах и поверхностях, что крайне важно знать для снижения уровня заболеваемости (впрочем, для этой цели обычная ОТ-ПЦР мало подходит, и используется метод культивирования коронавируса в клетках зеленой мартышки Vero-E6 [Qin et al., 2004]), а с другой стороны, наличие SARS-CoV-2 в сточных водах, куда вирус попадает с фекалиями больных, при проведении количественной оценки с помощью все той же ОТ-ПЦР может дать информацию о масштабах распространения COVID-19 [Mallapaty, 2020], в том числе опосредованно о количестве людей с бессимптомным протеканием болезни, и такие, как известно, уже есть. При этом все же сточные воды не рассматривают как источник разнесения инфекции, хотя и не исключают такой возможности [Lodder, de Roda Husman, 2020]. Но здесь можно привести информацию из одной недавней работы, где говорится, что доза вирусов SARS-CoV-2, необходимая для инфицирования, составляет не менее 10^6 копий/мл (или на образец) [Wölfel et al., 2020], и поэтому сточные воды вряд ли способны вызывать заражение. Поскольку подобных данных по SARS-CoV-2 пока немного, здесь будет привлечена аналогичная информация по родственным ему коронавирусам человека SARS-CoV и MERS-CoV.

Недавно опубликовано несколько работ, посвященных вопросам нахождения вирулентных вирусных частиц SARS-CoV-2 в аэрозоле и на различных поверхностях, что оценивалось путем культивирования вируса на клетках Vero-E6. Но поскольку данные несколько противоречивы, то каких-либо обобщающих выводов сделать не представляется возможным, и поэтому кратко приведем содержащуюся в этих статьях информацию. Так, было показано, что SARS-CoV-2 остается жизнеспособным в аэрозолях в течение трех часов при комнатной температуре, но его титр несколько уменьшается [van Doremalen et al., 2020]. В этой же работе отмечается, что вирус остается активным в течение 72 часов при пребывании на различных поверхностях, но при этом его титр заметно снизится. Так, быстрее всего вирус теряет свою вирулентность

на меди, затем на картоне, тогда как пластик и нержавеющая сталь показали довольно схожие результаты по «обеспечению» сохранности этого коронавируса, причем пластик способствовал «живучести» вирионов в чуть большей степени. Эти же авторы ранее исследовали жизнеспособность MERS-CoV и обнаружили, что его инфекционная способность сохраняется до 48 часов [van Doremalen et al., 2013]. В другой недавней работе сообщается, что вирулентный SARS-CoV-2 не удается обнаружить уже через три часа на бумаге, тогда как на деревянных поверхностях и на одежде он сохранялся до двух суток [Chin et al., 2020].

По вопросу выживаемости коронавирусов можно также обратиться к данным прежних лет, где проведена оценка жизнеспособности SARS-CoV и MERS-CoV, поскольку они должны быть похожи по этим характеристикам. Еще в 2003 г. с помощью культуры клеток Vero E6 весьма детально была изучена выживаемость SARS-CoV на различных поверхностях, в воде и в почве, а также в биологических образцах жизнедеятельности человека при различных температурах [Duan et al., 2003]. Оказалось, что на деревянных поверхностях, стекле, мозаике, металле, одежде, печатной и фильтровальной бумагах, пластике, а также в воде и почве (не говоря уже о биологических образцах) SARS-CoV уверенно сохраняет свою жизнеспособность при комнатной температуре, по крайней мере до 72 часов, а после 96 и 120 часов - она едва заметно проявляется лишь на некоторых поверхностях. В этой работе также оценивалось влияние ультрафиолета на коронавирус. Показано, что облучение довольно жестким ультрафиолетом с длиной волны 260 нм в течение 15 минут снижает вирулентность SARS-CoV лишь на треть. Получасовое облучение сохраняет жизнеспособность до 10%, и лишь через час сохраняющие свою инфекционность вирусы не обнаруживаются. Соответственно, абсолютной уверенности в том, что повышение инсоляции летом обеспечит исчезновение SARS-CoV-2, нет. Примеры некоторых южных стран, которые захлестнула волна COVID-19, свидетельствуют о том же.

Проводилось сравнение выживаемости SARS-CoV и другого коронавируса 229E, показавшее, что в высушенном состоянии первый сохранял вирулентность до 6 суток, тогда как второй ее терял уже через 24 часа [Rabenau et al., 2005]. Во время вспышки SARS в Канаде с помощью ОТ-ПЦР и культурального метода (после положительного ПЦР-теста) было проведено исследование наличия вирусных частиц в воздухе 15 больничных палат, где находились инфицированные пациенты, и некоторых других помещений клиники [Booth et al., 2005]. При

этом во многих случаях ПЦР-тесты были положительными, но инфицирующими свойствами такие образцы, если судить по культуре клеток Vero E-6, не обладали. В другой схожей работе также с помощью ПЦР и культурального метода анализировались различные поверхности в двух тайваньских госпиталях, показавшие в ряде случаев положительные тесты при ПЦР, но инфицирования культуры клеток ими не происходило [Dowell et al., 2004].

В одной из работ [Lai et al., 2005] исследовано сохранение инфекционных свойств вируса в комнатных условиях на обычной писчей бумаге. Показана невозможность заражения клеток Vero E-6 уже через 5 минут, если инфицирующая доза ($TCID_{50/ml}$)¹⁶ нанесенных на бумагу вирионов не превышала 10^4 . При инфицирующих дозах вируса в 10^5 и 10^6 их инфекционность для культуры клеток сохранялась 3 и 24 часа соответственно, что свидетельствует об экспериментальной и диагностической значимости определения исходной вирусной нагрузки. Пояснить это можно следующим образом. Во-первых, для инфицирования культуры клеток Vero-E6 и тем более человека недостаточно единичного вириона, поскольку организм с ним может легко справиться, в связи с чем требуется определенное (немалое) количество вирусных частиц, чтобы они проникли в клетку, нашли свой рецептор и начался процесс репликации. Здесь можно сослаться на уже упоминавшуюся выше недавнюю работу известных специалистов из Германии, в которой они отмечают, что успех выделения вируса SARS-CoV-2 из культуры клеток зависел в том числе от исходной вирусной нагрузки: образцы, содержавшие менее 10^6 копий вирионов на один мл (или на образец), никогда не давали изолята [Wölfel et al., 2020]. Во-вторых, вирусные частицы не погибают все одновременно, поскольку этот процесс носит растянутый во времени характер, несколько напоминая распад радиоактивных элементов, имеющих каждый свое время периода полураспада, который для вирусов можно условно назвать «периодом полужизни», когда половина вирионов потеряют свою инфицирующую способность. Поэтому вышеописанный эксперимент показал бы еще большую продолжительность сохранения инфицирующей способности данного коронавируса, нанесенного на ту же самую бумагу, если бы его исходная доза была соответственно больше. Например, экстраполируя приведенные в статье [Lai et al., 2005] сведения, можно предположить, что количество из 10^7 вирионов могло бы сохранять вирулентность такого образца приблизительно до 72 часов. В этой же статье

сообщалось, что в фекалиях SARS-CoV сохраняет инфекционность 4 суток, а в образцах из дыхательных путей – до 7 суток. Возвращаясь к работе немецких авторов, заметим, что они сообщают, что в мазке из горла максимальное количество вируса, обнаруживалось в течение первой недели симптомов с пиком в виде $7,11 \times 10^8$ копий молекул РНК (считай, вирусных частиц) [Wölfel et al., 2020]. Таким образом, диссеминация коронавируса SARS-CoV-2 в окружающую среду лицами, имеющими клинические проявления заболевания, может быть довольно значительной, что определяет его эпидемическое значение и актуальность борьбы с COVID-19.

Что касается живучести MERS-CoV, то подобные исследования (помимо того, что упомянуто выше [van Doremalen et al., 2013]) также проводились. В ходе южнокорейской вспышки этой инфекции были проанализированы окружающие больных многие госпитальные предметы и выявлена «долгоживучесть» этого коронавируса, достигающая нескольких суток [Bin et al., 2016]. Причем в этой работе авторы использовали не только культуральный метод, но и ОТ-ПЦР, выявляющую вирусную РНК уже после того как сами вирионы переставали быть вирулентными. В другой схожей работе оценивалось загрязнение коронавирусом MERS-CoV воздуха в больничных палатах и на окружающих предметах, причем учитывались вентиляционные потоки воздуха [Kim et al., 2016a]. Особенностью этого исследования было также и то, что в нем, помимо культурального метода и ОТ-ПЦР, применялись иммуоферментный анализ и электронная микроскопия. Выживаемость MERS-CoV в аэрозолях при разных температурах исследовалась и отечественными авторами [Pyankov et al., 2018]. Уже после начала эпидемии нового коронавируса SARS-CoV-2 в самом конце января 2020 г. был подготовлен обзор по персистенции коронавирусов на примере SARS-CoV и MERS-CoV [Kampf et al., 2020].

Как уже говорилось выше, заметный интерес представляет выяснение распространения SARS-CoV-2 среди населения с бессимптомными признаками носительства этого коронавируса. Конечно, это можно выявить с помощью тотальной ПЦР-диагностики (или иными способами амплификации РНК этого вируса) всего населения, но предлагается и иной путь в виде анализа сточных вод в населенных пунктах. И такие предпубликации уже появились. Причем, они возникли не на пустом месте, а базируются на подобных работах по детекции, проводившихся ранее, в том числе по обнаружению других вирусов. При этом необходимо заметить, что в таких подходах с ПЦР-детекцией вирусов в сточных водах, несущих различные ингибиторы ДНК полимераз, крайне важно исключать как

¹⁶ TCID – Tissue Culture Infective Dose

ложноотрицательные, так и ложноположительные результаты, которые будут кардинально исказить всю картину. На самом деле этого очень непросто достичь, хотя и возможно, о чем мы ранее подготовили ряд обзоров [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2011; Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2012; 2012a].

Еще в 2005 г. была опубликована статья, в которой сообщалось об анализе сточных вод (до их обеззараживания) в двух госпиталях в КНР на предмет наличия вируса SARS-CoV, что проводилось как культуральным методом, так и ОТ-ПЦР [Wang et al., 2005]. Было обнаружено, что живые вирусы в сточных водах выживают при температуре 4°C до 14 дней, а при 20°C – до двух дней, но при этом вирусная РНК уже неживых вирусов с помощью ПЦР обнаруживалась еще в течение 8 дней. В еще одной работе сообщалось о выживании другого коронавируса 229E и вируса полиомиелита в проточной воде и в стоках [Gundy et al., 2009]. Было показано, что при 4°C CoV 229E сохранял вирулентность до 100 дней, тогда как при 20°C – только десять дней. В сточных водах этот вирус терял способность к инфицированию за 2 – 4 дня. При этом полиовирус проявил во всех тестах гораздо большую живучесть.

Довольно значительное исследование сточных вод очистных сооружений Массачусетса на предмет наличия в них SARS-CoV-2 показало, что содержание в них вирусной РНК было выше, чем можно было ожидать, исходя из числа заболевших в тот момент на данной территории [Wu et al., 2020]. Для детекции SARS-CoV-2 с помощью ОТ-ПЦР ими был выбран участок гена S белка размером около 150 нуклеотидов. Применялись все необходимые контроли. Точность амплификации подтверждалась секвенированием. Схожая работа была выполнена в Нидерландах, где анализировались сточные воды шести городов и одного аэропорта [Medema et al., 2020]. Авторы для детекции SARS-CoV-2 выбрали три участка в генах N и E белков коронавируса. Результаты амплификации контролировались гелем-электрофорезом, подтверждающим ожидаемый размер ампликонов.

В этой связи остается еще сказать, что помимо культивирования вирусов в клетках Vero-E6, существуют и другие способы контроля их «жизненного» статуса [Zhang et al., 2019]. Одним из них является амплификация специфических фрагментов нуклеиновых кислот (как ДНК, так и РНК), которая должна проводиться только в определенных условиях, позволяющих дискриминировать «мертвые» вирусы от «живых»¹⁷.

¹⁷ Данное определение «мертвых» и «живых» вирусов перенесено из аналогичных работ по детекции

Если для бактерий подобных работ выполнено уже очень большое количество (что нами недавно рассмотрено [Баймиев и др. (Baumiev et al.), 2020]), то по вирусам такие исследования пока немногочисленны. Такими дискриминирующими агентами являются моноазиды этидия и пропиция, которые, проникая в поврежденные вирусные частицы, связываются с их нуклеиновыми кислотами, вызывая настолько сильное разрушение последних, что прохождение амплификации (ПЦР или какой другой) становится невозможным. Подобное разграничение уже показано для целого ряда живых и мертвых вирусов с ДНК- или РНК-геномами, находящихся как в воде, в сточных водах, фекалиях, так и в других средах [Parshionkar et al., 2010; Lee et al., 2015; Leifels et al., 2015; Fongaro et al., 2016; Quijada et al., 2016; Oristo et al., 2018]. Это подход, уступая по точности культивированию вирусов в клетках Vero E6, обладает важным преимуществом в виде быстроты анализа. Подобных работ с SARS-CoV-2 и другими коронавирусами пока нет, но нельзя исключать, что таковые появятся.

Нетривиальные вакцины против бетакоронавирусов

Безусловно, наиболее эффективным способом защиты всего человечества от COVID-19 является создание эффективной вакцины против данного коронавируса, и такая работа ведется по всему миру, включая нашу страну. Похоже, что без вакцинирования всего населения справиться с COVID-19 будет невозможно. В одной из недавних статей приведен перечень разрабатываемых за рубежом разных типов вакцин против SARS-CoV-2, но он далеко не полный [Chen et al., 2020], и поэтому ориентироваться на него в полной мере с тем, чтобы понять, что делается в мире, следует с осторожностью. Не желая к тому же вдаваться в рассмотрение разнообразия вакцин, хотим коснуться лишь некоторых нетривиальных подходов к ним и заметить следующее. Так случилось, что атипичная пневмония, вызываемая «старым» SARS-CoV, проявившая себя главным образом весной 2003 г., очень быстро сошла «на нет», и вакцину к ней разработать не успели. Хотя работы такие во многих странах велись, включая нетривиальные подходы, о

«живых» и «мертвых» бактерий, которые таковыми в действительности могут быть, тогда как вирусы все же стоит рассматривать как самостоятельный элемент Природы, не являющийся, строго говоря, ни живым, ни мертвым, поскольку вирионы «оживают» только при попадании внутрь клеток своего хозяина, находясь при этом в состоянии, пригодном для размножения.

которых упомянем ниже. Будь такая вакцина сейчас - возможно она могла бы оказывать некоторый защитный эффект от нового SARS-CoV-2, и на ее основе было бы проще изготовить более специфичную. Это подтверждается в том числе анализом иммуногенных детерминант, проведенным для SARS-CoV и SARS-CoV-2, свидетельствующим, что такая возможность использования прежних вакцин теоретически могла бы иметь место, поскольку, например, гомология S белков у этих бетакоронавирусов составляет около 87% [Kumar et al., 2020].

Однако работы по созданию вакцин против SARS-CoV велись и тогда, в начале 2000-х годов. Так, в ряде стран, например, ДНК-вакцины против SARS-CoV продолжали разрабатывать и после исчезновения этой инфекции, в результате чего вышли несколько статей на этот счет [Yang et al., 2004; Zeng et al., 2004; Zhao et al. 2004; Woo et al., 2005; Zakhartchouk et al. 2007]. Во всех этих работах ДНК-вакцины готовились на основе S-белка вируса, обладающего подходящей антигенной детерминантой. В еще одной работе для этой же цели использовался нуклеокапсидный белок N [Chunling et al., 2006]. По одному из исследовательских проектов разработчики сумели дойти до первой фазы клинических испытаний своей ДНК-вакцины на 10 добровольцах, приготовленной также на основе S-белка [Martin et al., 2008]. При этом сообщается, что испытываемая ДНК-вакцина обеспечивала появление специфических антител.

Спустя десятилетие появился MERS, который также бушевал недолго, но, как уже говорилось выше, совсем не исчез. Так, в одной из статей приводятся сведения по случаям заболевания этой инфекцией за период с 2012 по 2016 гг., из которых видно, что вирус MERS-CoV напоминал о себе в разных странах и даже имелись небольшие вспышки [Arabi et al., 2017]. Это явилось основанием для проведения работ по созданию вакцины против данного бетакоронавируса. В частности, тех же ДНК-вакцин [Muthumani et al., 2015; Al-amri et al., 2017; Chi et al., 2017]. В результате, летом 2019 г. было сообщено об испытаниях ДНК-вакцины против MERS-CoV на ранее неинфицированных этим вирусом 75 добровольцах, что продемонстрировало возникновение определенной защиты от данной инфекции с помощью такой вакцины [Modjarrad et al., 2019; Yoon, Kim, 2019].

Нами больше десятилетия назад на основе нуклеокапсидного белка N также был создан прототип ДНК-вакцины против хантавируса, имеющего трехсоставной фрагментированный РНК-геном и вызывающего геморрагическую лихорадку с почечным синдромом [Чубукова и др. Chubukova et al., 2008; Чубукова, Никоноров (Chubukova,

Nikonorov), 2008]. При внутримышечном введении соответствующей рекомбинантной плазмидной ДНК у мышей формировался специфический иммунный ответ, но в силу ряда причин до испытаний ту ДНК-вакцину довести не удалось.

В целом отношение к ДНК-вакцинам в обществе настороженное, и это не удивительно. Так, в одном из обзоров, посвященном ДНК-вакцинам, В.Г.Дебабов (Debabov) [1997] высказал предположение, что появившись ДНК-вакцины раньше остальных, то отношение к ним было бы иное, нежели сейчас, так как инъекция ДНК выглядит в настоящее время «повышенной грамотности» населения устрашающе из-за кажущейся неизвестности последствий, а к обычным вакцинам (часть которых также содержат вирусные ДНК или РНК!) все уже привыкли, но если бы они появились позже ДНК-вакцин, то им пришлось бы с трудом пробивать себе дорогу. Мы полностью разделяем его точку зрения и хотим заметить, что с момента выхода той статьи прошло уже больше двух десятилетий, но мало что изменилось. При этом ДНК-вакцинация обладает целым рядом преимуществ, однако к использованию такого подхода человечество видимо пока не очень готово, хотя совсем недавно появилось сообщение об успешном проведении в США испытаний на мышах ДНК-вакцины AV1959D для защиты от болезни Альцгеймера и готовности проводить клинические испытания на людях [Petrushina et al., 2020]. Появилась информация, что американская компания INOVIO Pharmaceuticals, Inc. уже готова начать клинические испытания на добровольцах своей ДНК-вакцины INO-4800 против COVID-19, созданной на основе INO-4700 против MERS-CoV, и возможно, что при успешном результате, учитывая пандемический характер этого заболевания, может произойти прорыв в ДНК-вакцинировании.

Существуют и другие нетривиальные подходы к вакцинированию. В частности, к ним можно отнести использование съедобных вакцин, продуцируемых трансгенными растениями [Sohrab et al., 2017; Kurup, Thomas, 2020]. Так, подобная вакцина была создана против вируса SARS-CoV в США еще в 2005 г. [Pogrebnyak et al., 2005]. Для этого был использован N-терминальный фрагмент S-белка вируса (S1), который в составе соответствующих генно-инженерных конструкций был перенесен в табак и томат. Было показано, что у мышей, которых кормили томатами с S1 белком этого коронавируса, повышались титры специфичных IgA антител. Но к тому времени SARS-CoV исчез, да и во многих странах отношение общества к трансгенным растениям, являющимся так называемыми ГМО (генетически-модифицированными организмами), еще более отрицательное, чем к ДНК-вакцинам (в

силу большей известности ГМО). При этом неприятие ГМО абсолютно обосновательно, в чем мы попытались убедить читателей в нескольких своих статьях в защиту ГМ-растений [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2014; 2015; Вершинина и др. (Verшинina et al.), 2020]. Однако хочется верить, что удобство съедобных вакцин все же когда-нибудь будет широко использоваться. Может, как раз ситуация с COVID-19 повлияет на взгляды людей к таким растениям, обладающих уникальными, в том числе защитными свойствами. И если поменяется отношение людей, например, к ГМО в лучшую сторону, то оно поменяется и к ДНК-вакцинам, и наоборот.

Впрочем, уже сообщается, что ведутся работы по созданию трансгенных растений табака, продуцирующих вакцину против COVID-19, в частности в Австралии, информация о чем выложена на сайте Международной службы по оценке применения агробιοтехнологий (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications — ISAAA), отслеживающей по всему миру ГМ-культуры (<http://www.isaaa.org/kc/cropbiotechupdate/article/default.asp?ID=18054>). От Австралии в борьбе с SARS-CoV-2 решили не отставать испанские ученые, эксплуатируя ту же технологию (<http://www.isaaa.org/kc/cropbiotechupdate/article/default.asp?ID=18065>). О планах получения вакцины против COVID-19 в трансгенных растениях табака на основе внедренного в него подходящего антигена также сообщает имеющий биотехнологическое подразделение в США гигант табачной промышленности British American Tobacco, намереваясь (если проводимые сейчас доклинические испытания пройдут успешно) производить от 1 до 3 миллионов доз еженедельно, начиная с июня 2020 г.

Однако существует и иной подход использования обычных, а не ГМ-растений как фабрик для наработки вакцин путем заражения их специальным рекомбинантным растительным вирусом, несущим нужную антигенную детерминанту против конкретной инфекции [Scotti, Rybicki, 2013; Петухова и др. (Petukhova et al.), 2013; Rybicki, 2019]. В этом случае образуются так называемые вирусоподобные частицы (VLP - Virus-Like Particle), служащие для вакцинирования. Данная технология относительно проста и легко масштабируема, поскольку «урожай» вирусов в таких растениях нарабатывается довольно быстро. К тому же вирусы растений абсолютно безопасны для человека, поскольку они нацелены исключительно на паразитирование в объектах из Царства растений. В связи с нынешней коронавирусной инфекцией следует заметить, что канадская фирма Medicago

(<https://www.medicago.com/en/covid-19-programs/>) 12 марта 2020 г. уже объявила, что с помощью растений табака ею получены VLP с SARS-CoV-2, что является первым шагом к созданию вакцины на их основе, а испытания на людях, по их заверениям, ориентировочно пройдут в июле - августе 2020 г. В одном из анонсов была даже использована некая игра слов, сообщающая, что фирма Medicago своей вакциной сможет «выкурить» коронавирус. Причем эта фирма уже имеет успешный опыт создания подобных вакцин в табаке, в частности, против гриппа. В нашей стране специалисты из МГУ также готовы использовать подобную технологию для создания вакцины против SARS-CoV-2 (<https://zen.yandex.ru/media/id/5e10eba33639e600b0d10a5e/bystro-deshevo-mnogo-v-mgu-raziasnili-vse-pliusy-vozmojnoi-rossiiskoi-vakciny-na-osnove-tabachnoi-mozaiki-5e7e911f96544a69b3c4d207>) при должном финансировании.

Заключение

Помимо того, что на протяжении многих лет нами изучались переносимые рыжей полевкой *Clethrionomys glareolus* хантавирусы серотипа Puumala (по новой классификации - *Puumala orthohantavirus* из рода *Orthohantavirus*, семейства *Hantaviridae*, порядка *Bunyvirales* из того же реалма *Riboviria*, что и коронавирусы) и поэтому определенный опыт работы с вирусной РНК был накоплен, в 2003 г. (когда только появилось заболевание ТОРС) под руководством одного из авторов данной статьи (Ю.М.Никоноров) в Башкирском государственном университете была выполнена дипломная работа «Создание генно-инженерных конструкций, содержащих под контролем промотора T7 уникальный фрагмент коронавируса, вызывающего атипичную пневмонию». В ходе той работы был выбран фрагмент нуклеотидной последовательности нуклеокапсидного белка, специфичный именно для SARS-CoV, и для создания нужной конструкции были синтезированы протяженные олигонуклеотиды. В итоге был сформирован фрагмент ДНК, кодирующий участок вирусной РНК, с целью использования последней в качестве положительного контроля для соответствующей тест-системы для диагностики SARS-CoV, поскольку применяемые в то время в диагностических наборах для этого фрагменты ДНК не вполне соответствовали этой цели в виду того, что коронавирус имеет РНК-геном, и производится обратнo-транскрипционная ПЦР с первой довольно критичной стадией в виде превращения молекул РНК в их ДНК копии. Спустя почти десятилетие в качестве положительного контроля было предложено использовать подобные конструкции,

обеспечивающие наработку в системе *in vitro* соответствующих молекул РНК для детекции MERS-CoV [Corman et al., 2012], о чем мы упомянули выше. Но SARS (ТОРС) из человеческой популяции быстро исчез, поэтому та наша работа продолжена не была. Тем не менее, интерес к коронавирусам у нас можно сказать давний. При этом мы также имеем весьма большой опыт работы с разнообразными реакциями амплификации нуклеиновых кислот, как управляемыми сменами температур, так и изотермическими. По этой тематике нами получен целый ряд патентов, как Российской Федерации, так и международных.

Что касается SARS-CoV-2, то существует вероятность, что этот вирус может остаться с человечеством надолго, если не навсегда. Хотя бы потому, что он уже распространился по миру очень широко. В этой связи можно напомнить, что SARS-CoV и MERS-CoV вместе поразили всего около 11 тысяч человек, а SARS-CoV-2 инфицировал за три месяца уже более миллиона. С помощью криоэлектронной микроскопии было обнаружено, что белок S коронавируса SARS-CoV-2 более тропен к рецепторам ACE2, чем белок S коронавируса SARS-CoV, что объясняет более высокую контагиозность и большую скорость распространения нового бетакоронавируса [Yan et al., 2020; Wrapp et al., 2020]. Однако со временем неизбежно произойдет (даже без вакцинации) природная иммунизация довольно значительной части общества, и люди станут не так восприимчивы к SARS-CoV-2, что ослабит распространение этого вируса. К тому же можно надеяться, что циркулирующие штаммы будут по большей части менее агрессивными¹⁸, ввиду того, что они имеют преимущество при распространении, поскольку люди, являющиеся их носителями, могут переносить болезнь почти бессимптомно, заражая свое окружение тем же мало агрессивным штаммом,

¹⁸ То есть со сниженной до 1 – 2% частотой летальных исходов, что, впрочем, зависит во многом от успешности лечения, от текущего здоровья конкретного человека, его индивидуальных особенностей, в частности его ангиотензин-превращающего фермента 2, служащего рецептором для этого бетакоронавируса, вместо нынешних 4% летальности, если судить по Китаю (где инфекция практически закончилась), точнее, сопоставляя количества в этой стране выздоровевших и умерших, но не приняв во внимание возможный (не берущийся в анализ) контингент населения с бессимптомным течением COVID-19, который не будет известен до тех пор, пока все население (или определенная его выборка) не будут проверены на наличие у них специфичных антител.

что приведет к увеличению уже упоминаемой иммунной прослойки в обществе. Что касается высокоагрессивных штаммов¹⁹, то заражающиеся таковыми люди из-за тяжелого течения болезни быстро изолируются и не имеют возможности передавать такой вирус дальше. При этом нельзя исключать локальные вспышки этой инфекции в будущем.

Учитывая вышесказанное, помимо разработки средств экстренной профилактики и лечения COVID-19, для ускоренного, высокочувствительного и специфичного выявления SARS-CoV-2 в биоматериале и объектах внешней среды требуются диагностические тест-системы, основанные на реакциях амплификации нуклеиновых кислот²⁰.

Уже полученный опыт по противодействию распространения пандемии коронавируса SARS-CoV-2 в России и в мире позволяет сделать ряд важных выводов:

1. Необходимо осуществление обязательного мониторинга эпидемиологической ситуации по всем известным возбудителям вирусной и бактериальной природы, с усилением мероприятий перед началом сезонных волн заболевания. Целью мониторинга является предварительная оценка наличия штамма/типа/вида возбудителя в популяции и скорости его распространения. Для этого требуется разработка систем многопараметрического анализа для выявления и идентификации возбудителей инфекционных заболеваний вирусной и бактериальной природы. На случай появления совершенно новых, не охарактеризованных ранее возбудителей инфекционных заболеваний для изучения их геномов необходимо использовать технологии полногеномного массового параллельного секвенирования и мономолекулярного секвенирования ДНК и РНК. Последняя позволяет осуществлять специфическую идентификацию

¹⁹ Отдельный интерес представляет дифференциация штаммов SARS-CoV-2 по степени их опасности для человека на основе различий в нуклеотидных (точнее даже в аминокислотных) последовательностях, и такой анализ, возможно, будет вскоре сделан, хотя следует заметить, что различий между изолятами (штаммами) довольно мало, однако может стать так, что буквально единичная замена нуклеотида, приводящая к замене конкретной аминокислоты, способна превратить некий штамм в более агрессивный, и наоборот.

²⁰ Также обязательно требуется иммуноферментным анализом детектировать вырабатываемые антитела к этому вирусу, но эта тема выходит за рамки данной статьи.

возбудителей инфекционных заболеваний в полевых условиях в режиме реального времени.

2. Необходимо разработать или оптимизировать противоэпидемические алгоритмы реагирования соответствующих подразделений ответственных организаций и силовых структур, в зависимости от того, какие возбудители будут выявляться в ходе эпидемиологического мониторинга.

3. Одним из уязвимых мест при ликвидации пандемии коронавируса SARS-CoV-2 на территории Российской Федерации оказалась критическая зависимость от импорта диагностического

лабораторного оборудования (приборов для ПЦР и ПЦР в реальном времени, роботизированных станций для выделения и раскапывания, дозаторов для постановки реакций и т.д.) и расходных материалов (пластиковых пробирок, наконечников для дозаторов).

Таким образом, в условиях современных вызовов и угроз очевидно, что для решения подобных проблемных вопросов необходимо поддерживать отечественные высокотехнологичные разработки, отечественное замещающее импорт производство и готовить высококвалифицированные научные кадры.

Приложение / Supplement

1	atg	tct	gat	aat	gga	ccc	caa	---	aat	cag	cga	aat	gca	ccc	cgc	att	acg	ttt	ggt	gga	57
2	---	..c	..a	57
3a	...	---	57
4	---	..ct	.g.	..ca	57
5	cca	..ct	.g.	..ca	60
6	tca	..c	..a	..t	.g.	..ca	60
7	tca	..c	..a	..t	.g.	..ca	60
1	ccc	tca	gat	tca	act	ggc	agt	aac	cag	aat	gga	gaa	cgc	agt	ggg	gcg	cga	tca	aaa	caa	117
2a	...	c..	117
3	g..t	..a	...	c..t	117
4a	..a	..t	...	g..t	..a	.g	c..	..g	117
5	...	a.	...	c..a	..ag.a	..a	a.g	c..g	...	120
6	...	a.a	..ag.a	..a	a.g	c..g	...	120
7	...	ata	..acg.a	..a	a.g	c..g	...	120
1	cgt	cag	aat	gga	gaa	cgc	agt	ggg	gcg	cga	tca	aaa	caa	cgt	cgg	ccc	caa	ggt	tta	ccc	177
2a	...	c..t	177
3t	..a	...	c..tt	177
4	..c	...	g..t	..a	..g	c..	..gc	..t	177
5	aacgaa	a.g	c..c	..a	180
6	aacgaa	a.g	c..g	..c	..a	180
7	aacgaa	a.g	c..g	..c	..a	180
1	aat	aat	act	gcg	tct	tgg	ttc	acc	gct	ctc	act	caa	cat	ggc	aag	gaa	gac	ctt	aaa	ttc	237
2g.	...	237
3g.	...	237
4agg	..ag.	237
5agg	..ag.	240
6agg	..ag.	240
7agg	..ag.	240
1	cct	cga	gga	caa	ggc	ggt	cca	att	aac	acc	aat	agc	agt	cca	gat	gac	caa	att	ggc	tac	297
2gt	297
3gct	g..	aa.	297
4gct	g..	aa.	297
5c	..gct	g..	300
6c	..gct	g..	300
7c	..gct	g..	300
1	tac	cga	aga	gct	acc	aga	cga	att	cgt	ggt	ggt	gac	ggt	aaa	atg	aaa	gat	ctc	agt	cca	357
2	357
3	357
4	c..	...	g..ca.gcc	..c	357
5	c..	...	g..gcgcc	..c	360
6	c..	...	g..gcgcc	..c	360
7	c..	...	g..gcgcc	..c	360
1	aga	tgg	tat	ttc	tac	tac	cta	gga	act	ggg	cca	gaa	gct	gga	ctt	ccc	tat	ggt	gct	aac	417
2c	..t	gga	act	ggg	cca	gaa	gct	gga	ctt	ccc	tat	ggt	gct	...	417
3c	..t	gga	act	ggg	cca	gaa	gct	gga	ctt	ccc	tat	ggt	gct	...	417
4c	..t	..t	gga	act	ggg	cca	gaa	gct	gga	ctt	ccc	tat	ggt	gct	...	417
5c	..t	..t	gga	act	ggg	cca	gaa	gct	gga	ctt	ccc	tat	ggt	gct	...	420
6c	..t	..t	gga	act	ggg	cca	gaa	gct	gga	ctt	ccc	tat	ggt	gct	...	420
7c	..t	..t	gga	act	ggg	cca	gaa	gct	gga	ctt	ccc	tat	ggt	gct	...	420

Бетакоронавирусы и их детекция

1	aaa	gac	ggc	atc	ata	tgg	ggt	gca	act	gag	gga	gcc	ttg	aat	aca	cca	aaa	gat	cac	att	477
2	477
3	477
4	477
5	480
6	480
7	480
1	ggc	acc	cgc	aat	cct	gct	aac	aat	gct	gca	atc	gtg	cta	caa	ctt	cct	caa	gga	aca	aca	537
2	537
3	537
4	537
5	540
6	540
7	540
1	ttg	cca	aaa	ggc	ttc	tac	gca	gaa	ggg	agc	aga	ggc	ggc	agt	caa	gcc	tct	tct	cgf	tcc	597
2	597
3	597
4	597
5	600
6	600
7	600
1	tca	tca	cgf	agt	cgf	aac	agt	tca	aga	aat	tca	act	cca	ggc	agc	agt	agg	gga	act	tct	657
2	657
3	657
4	657
5	660
6	660
7	660
1	cct	gct	aga	atg	gct	ggc	aat	ggc	ggf	gat	gct	gct	ctt	gct	ttg	ctg	ctg	ctt	gac	aga	717
2	717
3	717
4	717
5	720
6	720
7	720
1	ttg	aac	cag	ctt	gag	agc	aaa	atg	tct	ggt	aaa	ggc	caa	caa	caa	caa	ggc	caa	act	gfc	777
2	777
3	777
4	777
5	780
6	780
7	780
1	act	aag	aaa	tct	gct	gct	gag	gct	tct	aag	aag	cct	cgf	caa	aaa	cgf	act	gcc	act	aaa	837
2	837
3	837
4	837
5	840
6	840
7	840
1	gca	tac	aat	gta	aca	caa	gct	ttc	ggc	aga	cgf	ggt	cca	gaa	caa	acc	caa	gga	aat	ttt	897
2	897
3	897
4	897
5	900
6	900
7	900
1	ggg	gac	cag	gaa	cta	atc	aga	caa	gga	act	gat	tac	aaa	cat	tgg	ccg	caa	att	gca	caa	957
2	957
3	957
4	957
5	960
6	960
7	960

1	t t t	g c c	c c c	a g c	g c t	t c a	g c g	t t c	t t c	g g a	a t g	t c g	c g c	a t t	g g c	a t g	g a a	g t c	a c a	c c t	1017
2	1017
3t	..tt	..a	1017
4t	..a	..t	..c	..t	..aa	1017
5t	..g	..t	..c	..t	..aa	1020
6t	..a	..t	..c	..t	..ata	1020
7t	..a	..t	..c	..t	..ata	1020
1	t c g	g g a	a c g	t g g	t t g	a c c	t a c	a c a	g g t	g c c	a t c	a a a	t t g	g a t	g a c	a a a	g a t	c c a	a a t	t t c	1077
2tt	1077
3c	1077
4	.t.a	...	c..	..t	..t	cat	..aa	c.a	...	1077
5a	...	c..	..t	..t	cat	..at	c.a	...	1080
6a	...	c..	..t	..t	cat	..at	c.a	...	1080
7a	...	c..	..t	..t	cat	..at	c.a	...	1080
1	a a a	g a t	c a a	g t c	a t t	t t g	c t g	a a t	a a g	c a t	a t t	g a c	g c a	t a c	a a a	a c a	t t c	c c a	c c a	a c a	1137
2c	1137
3c	1137
4c	a.cac	g..	1137
5c	a.ca	c..cc	1140
6c	a.ca	c..cc	1140
7c	a.ca	c..cc	1140
1	g a g	c c t	a a a	a a g	g a c	a a a	a a g	a a g	a a g	g c t	g a t	g a a	a c t	c a a	g c c	t t a	c c g	c a g	a g a	c a g	1197
2	g a g	g a t	g a a	...	c a a	g c c	t t a	c c g	c a g	a g a	c a g	1197
3	1197
4a	...	a..	g..	..g	c.t	a..	...	1197
5a	...	a..	g..	..g	c.ta	...	1200
6a	...	a..	g..	..g	c.t	..ga	...	1200
7a	...	a..	g..	..g	c.t	..ga	...	1200
1	a a g	a a a	c a g	c a a	a c t	g t g	a c t	c t t	c t t	c c t	g c t	g c a	g a t	t t g	g a t	g a t	t t c	t c c	a a a	c a a	1257
2c	1257
3a	..cc	..n	nnn	nnn	nnn	nnn	ntc	etc	c.t	a..	1257
4	...	c.g	..cc	act	gtg	act	c..	..g	.c.	g.g	---	---	a..g.	1254
5gccg	..t	..c	a..g.	...	1260
6gccg	..t	..c	a..g.	...	1260
7gccg	..t	..c	a..g.	...	1260
1	t t g	c a a	c a a	t c c	a t g	a g c	a g t	g c t	---	---	g a c	t c a	a c t	c a g	g c c	t a a	1299	1299
2	---	---	..t	1299	1299
3	---	---	..tt	1299	1299
4	c.t	...	a.tt	g.a	...	tct	gcc	..ta	...	1302	1302
5	c.t	...	a.tt	g.a	...	tct	gct	..ta	...	1308	1308
6	c.t	...	a.tt	g.a	...	tct	gct	..ta	...	1308	1308
7	c.t	...	a.tt	g.a	...	tct	gct	..ta	...	1308	1308

Рис. 8. Потриплетное сравнение нуклеотидных последовательностей гена N белка некоторых сарбековирусов. 1 – SARS-CoV-2, 2 – Bat CoV RaTG13, 3 - CoV панголина, 4 - Bat CoV SHC014, 5 – SARS-CoV, 6 – CoV циветы, 7 – Bat CoV. Точками показаны совпадающие нуклеотиды, дефис – обозначает делецию. Замены нуклеотидов, приводящие к заменам аминокислот приведены на желтом фоне. Сиреневым фоном выделены триплеты у коронавируса панголина, на которые пришлось недостоверно прочитанные нуклеотиды, приведенные как «n» и ведут ли в действительности истинные нуклеотиды в этих местах к заменам аминокислот - неизвестно.

Fig. 8. Comparison of nucleotide sequences of nucleocapsid gene of some sarbecoviruses.

1 – SARS-CoV-2, 2 - Bat CoV RaTG13, 3 - pangolin CoV, 4 - Bat CoV SHC014, 5 - SARS-CoV, 6 - civet CoV, 7 - Bat CoV. The dots represent matching nucleotides, and the hyphen indicates a deletion. Nucleotide substitutions that lead to amino acid substitutions are shown on a yellow background. Purple background highlights triplets in the coronavirus from pangolin, which were incorrectly read nucleotides listed as "n" and whether the true nucleotides in these places actually lead to amino acid replacements – is unknown.

Литература

1. Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал.Х., Кулуев Б.Р., Швец К.Ю., Ямиданов Р.С., Матниязов Р.Т., Чемерис Д.А., Зубов В.В., Алексеев Я.И., Мавзютов

А.Р., Иваненков Я.А., Чемерис А.В. Современные подходы к дифференциации живых и мертвых микроорганизмов путем избирательной амплификации их нуклеиновых кислот //

- Микробиология. 2020. Т.89(1). С. 17-33. DOI: 10.31857/S0026365620010036.
2. Вершинина З.Р., Кулуев Б.Р., Максимов И.В., Михайлова Е.В., Гумерова Г.Р., Малеев Г.В., Князев А.В., Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. ГМО запретить невозможно разрешить! // *Биомика*. 2020. Т. 12 (1). С. 80-120. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-6.
 3. Гарафутдинов Р.Р., Галимова А.А., Сахабутдинова А.Р., Вахитов В.А., Чемерис А.В. ПЦР-амплификация ДНК с помощью праймеров «встык» // *Молекулярная биология*. 2015. Т. 49, № 4. С. 628-637. doi: 10.7868/S0026898415040059
 4. Дебабов В.Г. ДНК-вакцинация и генотерапия на основе транзientной экспрессии нуклеиновых кислот в соматических клетках человека и животных // *Молекулярная биология*. 1997. Т.31(2). С.209-215.
 5. Кулуев Б.Р., Баймиев Ан.Х., Чемерис Д.А., Матниязов Р.Т., Геращенко Г.А., Никоноров Ю.М., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Применение CRISPR-локусов не для редактирования геномов // *Биомика*. 2017. Т. 9. С.271-283.
 6. Петухова Н.В., Иванов П.А., Мигунов А.И. Вирусоподобные частицы - новая стратегия для создания противогриппозных вакцин // *Вопросы вирусологии*. 2013. Т. 58 (2). С.10-14.
 7. Чемерис А.В. CRISPR/Cas системы (специальный тематический выпуск журнала) // *Биомика*. 2017. Т.9(3). С. 148-154.
 8. Чемерис А.В., Бикбулатова С.М., Чемерис Д.А., Баймиев Ал.Х., Князев А.В., Кулуев Б.Р., Максимов И.В. Надо ли опасаться ГМО? Взгляд несторонних наблюдателей на истерию вокруг // *Биомика*. 2014. Т.6. С.77-138.
 9. Чемерис А.В., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Вахитов В.А. Как исключить появление ложнопозитивных результатов при проведении полимеразной цепной реакции // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии*. 2012. Т. 8. С. 34-45.
 10. Чемерис А.В., Чемерис Д.А., Баймиев Ал.Х., Князев А.В., Кулуев Б.Р., Максимов И.В. Борьба с ГМО как неолысенковщина // *Биомика*. 2015. Т.7. С. 1-39.
 11. Чемерис А.В., Чемерис Д.А., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Нагаев Н.Р., Вахитов В.А. Причины ложно-негативной ПЦР и недопущение некоторых из них // *Биомика*. 2012. Т.4. С.31-47.
 12. Чемерис Д.А., Гарафутдинов Р.Р., Сахабутдинова А.Р., Малеев Г.В., Чемерис А.В. Конвекционная ПЦР в конвективных ячейках разных типов // *Биомика*. 2018. Т.10(4). С. 410-443. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-52.
 13. Чемерис Д.А., Магданов Э.Г., Машков О.И., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В. ПЦР с отложенным (горячим или задержанным) стартом // *Биомика*. 2011. Т. 2. № 1. С. 1-8.
 14. Чубукова О.В., Никоноров Ю.М. Перспективы применения ДНК-вакцин в профилактике хантавирусных инфекций // *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2008. №2. С. 37-40.
 15. Чубукова О.В., Хасанова С.С., Никоноров Ю.М., Кулагин В.Ф., Чемерис А.В., Вахитов В.А. Иммуногенность N-белка хантавируса Пуумала для беспородных мышей при внутримышечном введении его гена // *Вопросы вирусологии*. 2008. Т. 53 (4). С. 38-41.
 16. Abd El Wahed A., Patel P., Heidenreich D., Hufert F.T., Weidmann M. Reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for the detection of middle East respiratory syndrome coronavirus // *PLoS Currents*. 2013. V. 5. pii: ecurrents.outbreaks.62df1c7c75ffc96cd59034531e2e8364. doi: 10.1371/currents.outbreaks.62df1c7c75ffc96cd59034531e2e8364.
 17. Ai T., Yang Z., Hou H., Zhan C., Chen C., Lv W., Tao Q., Sun Z., Xia L. Correlation of Chest CT and RT-PCR Testing in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in China: A Report of 1014 Cases // *Radiology*. 2020. 200642. doi: 10.1148/radiol.2020200642.
 18. Al-Abdallat M.M., Payne D.C., Alqasrawi S., Rha B., Tohme R.A., Abedi G.R., Al Nsour M., Iblan I., Jarour N., Farag N.H., Haddadin A., Al-Sanouri T., Tamin A., Harcourt J.L., Kuhar D.T., Swerdlow D.L., Erdman D.D., Pallansch M.A., Haynes L.M., Gerber S.I. Hospital-associated outbreak of Middle East respiratory syndrome coronavirus: a serologic, epidemiologic, and clinical description // *Clinical Infectious Diseases*. 2014. V. 59 (9). P. 1225-33. doi: 10.1093/cid/ciu359.
 19. Alagaili A.N., Briese T., Mishra N., Kapoor V., Sameroff S.C., Burbelo P.D., de Wit E., Munster V.J., Hensley L.E., Zalmout I.S., Kapoor A., Epstein J.H., Karesh W.B., Daszak P., Mohammed O.B., Lipkin W.I. Middle East respiratory syndrome coronavirus infection in dromedary camels in Saudi Arabia // *mBio*. 2014. V. 5 (2). e00884-14. doi: 10.1128/mBio.00884-14.
 20. Al-Amri S.S., Abbas A.T., Siddiq L.A., Alghamdi A., Sanki M.A., Al-Muhanna M.K., Alhabbab R.Y., Azhar E.I., Li X., Hashem A.M. Immunogenicity of Candidate MERS-CoV DNA Vaccines Based on the Spike Protein // *Scientific Reports*. 2017. V. 7. 44875. doi: 10.1038/srep44875.
 21. Andersen K.G., Rambaut A., Lipkin W.I., Holmes E.C., Garry R.F. The proximal origin of SARS-CoV-2 // *Nature Medicine*. 2020. V. 26. P. 450-452. doi: 10.1038/s41591-020-0820-9.

22. Arabi Y.M., Balkhy H.H., Hayden F.G., Bouchama A., Luke T., Baillie J.K., Al-Omari A., Hajeer A.H., Senga M., Denison M.R., Nguyen-Van-Tam J.S., Shindo N., Birmingham A., Chappell J.D., Van Kerkhove M.D., Fowler R.A. Middle East Respiratory Syndrome // *New England Journal of Medicine*. 2017. V. 376 (6). P. 584-594. doi: 10.1056/NEJMSr1408795.
23. Azhar E.I., El-Kafrawy S.A., Farraj S.A., Hassan A.M., Al-Saeed M.S., Hashem A.M., Madani T.A.. Evidence for camel-to-human transmission of MERS coronavirus // *New England Journal of Medicine*. 2014. V. 370 (26). P. 2499-505. doi: 10.1056/NEJMoal401505.
24. Baek YH, Um J, Antigua KJC, Park JH, Kim Y, Oh S, Kim YI, Choi WS, Kim SG, Jeong JH, Chin BS, Nicolas HDG, Ahn JY, Shin KS, Choi YK, Park JS, Song MS. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification as a rapid early-detection method for novel SARS-CoV-2 // *Emerg Microbes Infect.* 2020. doi: 10.1080/22221751.2020.1756698.
25. Becker M.M., Graham R.L., Donaldson E.F., Rockx B., Sims A.C., Sheahan T., Pickles R.J., Corti D., Johnston R.E., Baric R.S., Denison M.R. Synthetic recombinant bat SARS-like coronavirus is infectious in cultured cells and in mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105 (50). P. 19944-9. doi: 10.1073/pnas.0808116105.
26. Benvenuto D., Giovanetti M., Ciccozzi A., Spoto S., Angeletti S., Ciccozzi M. The 2019-new coronavirus epidemic: Evidence for virus evolution // *Journal of Medical Virology*. 2020. V. 92 (4). P. 455-459. doi: 10.1002/jmv.25688.
27. Bin S.Y., Heo J.Y., Song M.-S., Lee J., Kim E.-H., Park S.-J., Kwon H.-I., Kim S.-M., Kim Y.-I., Si Y.-J., Lee I.-W., Baek Y.H., Choi W.-S., Min J., Jeong H.W., Choi Y.K. Environmental Contamination and Viral Shedding in MERS Patients During MERS-CoV Outbreak in South Korea // *Clinical Infectious Diseases*. 2016. V. 62 (6). P. 755-60. doi: 10.1093/cid/civ1020.
28. Booth T.F., Kournikakis B., Bastien N., Ho J., Kobasa D., Stadnyk L., Li Y., Spence M., Paton S., Henry B., Mederski B., White D., Low D.E., McGeer A., Simor A., Vearncombe M., Downey J., Jamieson F.B., Tang P., Plummer F. Detection of airborne severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus and environmental contamination in SARS outbreak units // *Journal of Infectious Diseases*. 2005. V. 191 (9). P. 1472-7. doi: 10.1086/429634.
29. Broughton J.P., Deng X., Yu G., Fasching C.L., Servellita V., Singh J., Miao X., Streithorst J.A., Granados A., Sotomayor-Gonzalez A., Zorn K., Gopez A., Hsu E., Gu W., Miller S., Pan C.-Y., Guevara H., Wadford D.A., Chen J.C., Chiu C.Y. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2 // *Nature Biotechnology*. 2020. doi: 10.1038/s41587-020-0513-4.
30. Cagliani R., Forni D., Clerici M., Sironi M. Computational inference of selection underlying the evolution of the novel coronavirus, SARS-CoV-2 // *Journal of Virology*. 2020. pii: JVI.00411-20. doi: 10.1128/JVI.00411-20.
31. Ceraolo C., Giorgi F.M. Genomic variance of the 2019-nCoV coronavirus // *Journal of Medical Virology*. 2020. V. 92 (5). P. 522-528. doi: 10.1002/jmv.25700.
32. Chan J.F., Choi G.K., Tsang A.K., Tee K.M., Lam H.Y., Yip C.C., To K.K., Cheng V.C., Yeung M.L., Lau S.K., Woo P.C., Chan K.H., Tang B.S., Yuen K.Y. Development and Evaluation of Novel Real-Time Reverse Transcription-PCR Assays with Locked Nucleic Acid Probes Targeting Leader Sequences of Human-Pathogenic Coronaviruses // *Journal of Clinical Microbiology*. 2015. V. 53 (8). P. 2722-6. doi: 10.1128/JCM.01224-15.
33. Chan J.F., Yip C.C., To K.K., Tang T.H., Wong S.C., Leung K.H., Fung A.Y., Ng A.C., Zou Z., Tsoi H.W., Choi G.K., Tam A.R., Cheng V.C., Chan K.H., Tsang O.T., Yuen K.Y. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay validated in vitro and with clinical specimens // *Journal of Clinical Microbiology*. 2020. V. pii: JCM.00310-20. doi: 10.1128/JCM.00310-20.
34. Chantratita W., Pongtanapisit W., Piroj W., Srichunrasmi C., Seesuai S. Development and comparison of the real-time amplification based methods--NASBA-Beacon, RT-PCR taqman and RT-PCR hybridization probe assays--for the qualitative detection of sars coronavirus // *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 2004. V. 35 (3). P. 623-9.
35. Chen L., Liu W., Zhang Q., Xu K., Ye G., Wu W., Sun Z., Liu F., Wu K., Zhong B., Mei Y., Zhang W., Chen Y., Li Y., Shi M., Lan K., Liu Y. RNA based mNGS approach identifies a novel human coronavirus from two individual pneumonia cases in 2019 Wuhan outbreak // *Emerging Microbes and Infections*. 2020. V. 9(1). P.313-319. doi: 10.1080/22221751.2020.1725399.
36. Chen W., Li S., Shao B., Zheng T., Jiang S., Huang X., Cai K., Zhang Z. Preliminary study on the detection of the SARS-CoV specific target cDNA fragments by multiplex PCR // *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2004. V.2(1). P.55-8. doi: 10.1016/s1672-0229(04)02008-x.
37. Chen W., Xu Z., Mu J., He B., Yang L., Lin L., Meng S., Mu F., Gan H., Huang S., Wen J., Fang J., Wang J. Real-time quantitative fluorescent reverse transcriptase-PCR for detection of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus RNA //

- Molecular Diagnostics*. 2004. V. 8 (4). P. :231-5. doi: 10.1007/bf03260067.
38. Chen W.H., Strych U., Hotez P.J., Bottazzi M.E. The SARS-CoV-2 Vaccine Pipeline: an Overview // *Current Tropical Medicine Reports*. 2020. P. 1-4. doi: 10.1007/s40475-020-00201-6.
39. Chi H., Zheng X., Wang X., Wang C., Wang H., Gai W., Perlman S., Yang S., Zhao J., Xia X. DNA vaccine encoding Middle East respiratory syndrome coronavirus S1 protein induces protective immune responses in mice // *Vaccine*. 2017. V. 35 (16). P. 2069-2075. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.02.063.
40. Chin A.W.H., Chu J.T.S., Perera M.R.A., Hui K.P.Y., Yen H.-L., Chan M.C.W., Peiris M., Poon L.L.M. Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions // *medRxiv*. 2020. doi: 10.1016/S2666-5247(20)30003-3.
41. Chu D.K.W., Pan Y., Cheng S.M.S., Hui K.P.Y., Krishnan P., Liu Y., Ng D.Y.M., Wan C.K.C., Yang P., Wang Q., Peiris M., Poon L.L.M. Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia // *Clinical Chemistry*. 2020. V. 66 (4). P. 549-555. doi: 10.1093/clinchem/hvaa029.
42. Chui L., Drebot M., Andonov A., Petrich A., Glushek M., Mahony J. Comparison of 9 different PCR primers for the rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus using 2 RNA extraction methods // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2005. V. 53 (1). P. 47-55. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2005.03.007.
43. Chunling M., Kun Y., Jian X., Jian Q., Hua S., Minsheng Z. Enhanced induction of SARS-CoV nucleocapsid protein-specific immune response using DNA vaccination followed by adenovirus boosting in BALB/c mice // *Intervirology*. 2006. V. 49 (5). P. 307-18. doi: 10.1159/000094247.
44. Cockrell A.S., Beall A., Yount B., Baric R. Efficient Reverse Genetic Systems for Rapid Genetic Manipulation of Emergent and Preemergent Infectious Coronaviruses // *Methods in Molecular Biology*. 2017. V. 1602. P. 59-81. doi: 10.1007/978-1-4939-6964-7_5.
45. Cohen J. New coronavirus threat galvanizes scientists // *Science*. 2020. V.367(6477). P.492-493. doi: 10.1126/science.367.6477.492.
46. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification // *Nature*. 1991. V. 350. P. 91-92. doi: 10.1038/350091a0.
47. Corman V.M., Eckerle I., Bleicker T., Zaki A., Landt O., Eschbach-Bludau M., van Boheemen S., Gopal R., Ballhause M., Bestebroer T.M., Muth D., Müller M.A., Drexler J.F., Zambon M., Osterhaus A.D., Fouchier R.M., Drosten C. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction // *Euro Surveillance*. 2012. V.17(39). pii: 20285. doi: 10.2807/ese.17.39.20285-en.
48. Corman V.M., Kallies R., Philipps H., Göpner G., Müller M.A., Eckerle I., Brünink S., Drosten C., Drexler J.F. Characterization of a novel betacoronavirus related to middle East respiratory syndrome coronavirus in European hedgehogs // *Journal of Virology*. 2014. V. 88 (1). P. 717-24. doi: 10.1128/JVI.01600-13.
49. Corman V.M., Landt O., Kaiser M., Molenkamp R., Meijer A., Chu D.K.W., Bleicker T., Brünink S., Schneider J., Schmidt M.L., Mulders D.G.J.C., Haagmans B.L., van der Veer B., van den Brink S., Wijsman L., Goderski G., Romette J.L., Ellis J., Zambon M., Peiris M., Goossens H., Reusken C., Koopmans M.P.G., Drosten C. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR // *Euro Surveillance*. 2020. V. 25 (3). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
50. Corman V.M., Müller M.A., Costabel U., Timm J., Binger T., Meyer B., Kreher P., Lattwein E., Eschbach-Bludau M., Nitsche A., Bleicker T., Landt O., Schweiger B., Drexler J.F., Osterhaus A.D., Haagmans B.L., Dittmer U., Bonin F., Wolff T., Drosten C. Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections // *Euro Surveillance*. 2012a. V. 17 (49). pii: 20334. doi: 10.2807/ese.17.49.20334-en.
51. Corman V.M., Ölschläger S., Wendtner C.M., Drexler J.F., Hess M., Drosten C. Performance and clinical validation of the RealStar MERS-CoV Kit for detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus RNA // *Journal of Clinical Virology*. 2014a. V.60 (2). P. 168-71. doi: 10.1016/j.jcv.2014.03.012.
52. Cotten M., Lam T.T., Watson S.J., Palser A.L., Petrova V., Grant P., Pybus O.G., Rambaut A., Guan Y., Pillay D., Kellam P., Nastouli E. Full-genome deep sequencing and phylogenetic analysis of novel human betacoronavirus // *Emerging Infectious Diseases*. 2013. V. 19 (5). P. 736-42B. doi: 10.3201/eid1905.130057.
53. Curi L., Federico P.-B., Gimenez C.A. An ultrasensitive, rapid, and portable coronavirus SARS-CoV-2 sequence detection method based on CRISPR-Cas12 // *bioRxiv*. doi: 10.1101/2020.02.29.971127.
54. de Groot R.J., Baker S.C., Baric R.S., Brown C.S., Drosten C., Enjuanes L., Fouchier R.A., Galiano M., Gorbalenya A.E., Memish Z.A., Perlman S., Poon L.L., Snijder E.J., Stephens G.M., Woo P.C., Zaki A.M., Zambon M., Ziebuhr J. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group // *Journal of Virology*. 2013. V. 87 (14). P. 7790-2. doi: 10.1128/JVI.01244-13.
55. Ding X., Yin K., Li Z., Liu C. All-in-One Dual CRISPR-Cas12a (AIOD-CRISPR) Assay: A Case for Rapid, Ultrasensitive and Visual Detection of Novel

- Coronavirus SARS-CoV-2 and HIV virus // *bioRxiv*. 2020. doi: 10.1101/2020.03.19.998724.
56. Douglas C.E., Kulesh D.A., Jaissle J.G., Minogue T.D. Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction assays for Middle East Respiratory Syndrome // *Molecular and Cellular Probes*. 2015. V. 29 (6). P. 511-513. doi: 10.1016/j.mcp.2015.09.001.
57. Dowell S.F., Simmerman J.M., Erdman D.D., Wu J.S., Chaovavanich A., Javadi M., Yang J.Y., Anderson L.J., Tong S., Ho M.S. Severe acute respiratory syndrome coronavirus on hospital surfaces // *Clinical Infectious Diseases*. 2004. V. 39 (5). P. 652-7. doi: 10.1086/422652.
58. Drexler J.F., Gloza-Rausch F., Glende J., Corman V.M., Muth D., Goettsche M., Seebens A., Niedrig M., Pfefferle S., Yordanov S., Zhelyazkov L., Hermanns U., Vallo P., Lukashov A., Müller M.A., Deng H., Herrler G., Drosten C. Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences // *Journal of Virology*. 2010. V. 84 (21). P. 11336-49. doi: 10.1128/JVI.00650-10.
59. Drosten C., Günther S., Preiser W., van der Werf S., Brodt H.R., Becker S., Rabenau H., Panning M., Kolesnikova L., Fouchier R.A., Berger A., Burguière A.M., Cinatl J., Eickmann M., Escriou N., Grywna K., Kramme S., Manuguerra J.C., Müller S., Rickerts V., Stürmer M., Vieth S., Klenk H.D., Osterhaus A.D., Schmitz H., Doerr H.W. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome // *New England Journal of Medicine*. 2003. V. 348 (20). P. 1967-76. doi: 10.1056/NEJMoa030747.
60. Duan S.M., Zhao X.S., Wen R.F., Huang J.J., Pi G.H., Zhang S.X., Han J., Bi S.L., Ruan L., Dong X.P. Stability of SARS coronavirus in human specimens and environment and its sensitivity to heating and UV irradiation // *Biomedical and Environmental Sciences*. 2003. V. 16 (3). P. 246-55.
61. El-Tholoth M, Bau HH, Song J. A Single and Two-Stage, Closed-Tube, Molecular Test for the 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) at Home, Clinic, and Points of Entry // *ChemRxiv*. 2020. DOI: 10.26434/chemrxiv.11860137.v
62. Escutenaire S., Mohamed N., Isaksson M., Thorén P., Klingeborn B., Belák S., Berg M., Blomberg J. SYBR Green real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the generic detection of coronaviruses // *Archives of Virology*. 2007. V. 152 (1). P. 41-58. doi: 10.1007/s00705-006-0840-x.
63. Fang Y., Zhang H., Xie J., Lin M., Ying L., Pang P., Ji W. Sensitivity of Chest CT for COVID-19: Comparison to RT-PCR // *Radiology*. 2020. 200432. doi: 10.1148/radiol.2020200432.
64. Fongaro G., Hernández M., García-González M.C., Barardi C.R., Rodríguez-Lázaro D. Propidium Monoazide Coupled with PCR Predicts Infectivity of Enteric Viruses in Swine Manure and Biofertilized Soil // *Food and Environmental Virology*. 2016. V. 8 (1). P. 79-85. doi: 10.1007/s12560-015-9225-1.
65. Forster P., Forster L., Renfrew C., Forster M. Phylogenetic network analysis of SARS-CoV-2 genomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020. pii: 202004999. doi: 10.1073/pnas.2004999117.
66. Gao Y., Yan L., Huang Y., Liu F., Zhao Y., Cao L., Wang T., Sun Q., Ming Z., Zhang L., Ge J., Zheng L., Zhang Y., Wang H., Zhu Y., Zhu C., Hu T., Hua T., Zhang B., Yang X., Li J., Yang H., Liu Z., Xu W., Guddat L.W., Wang Q., Lou Z., Rao Z. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus // *Science*. 2020. pii: eabb7498. doi: 10.1126/science.abb7498.
67. Garafutdinov R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R. Polymerase chain reaction with nearby primers // *Analytical Biochemistry*. 2017. V. 518. P. 126-133. doi: 10.1016/j.ab.2016.11.017.
68. Ge X.Y., Li J.L., Yang X.L., Chmura A.A., Zhu G., Epstein J.H., Mazet J.K., Hu B., Zhang W., Peng C., Zhang Y.J., Luo C.M., Tan B., Wang N., Zhu Y., Crameri G., Zhang S.Y., Wang L.F., Daszak P., Shi Z.L. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor // *Nature*. 2013. V. 503 (7477). P. 535-8. doi: 10.1038/nature12711.
69. Glushakova L.G., Sharma N., Hoshika S., Bradley A.C., Bradley K.M., Yang Z., Benner S.A. Detecting respiratory viral RNA using expanded genetic alphabets and self-avoiding DNA // *Analytical Biochemistry*. 2015. V. 489. P. 62-72. doi: 10.1016/j.ab.2015.08.015.
70. Go Y.Y., Kim Y.S., Cheon S., Nam S., Ku K.B., Kim M., Cho N.H., Park H., Lee P., Lin Y.C., Tsai Y.L., Wang H.T., Balasuriya U.B.R. Evaluation and Clinical Validation of Two Field-Deployable Reverse Transcription-Insulated Isothermal PCR Assays for the Detection of the Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus // *Journal of Molecular Diagnostics*. 2017. V. 19 (6). P. 817-827. doi: 10.1016/j.jmoldx.2017.06.007.
71. Goralenya A.E., Baker S.C., Baric R.S., de Groot R.J., Drosten C., Gulyaeva A.A., Haagmans B.L., Lauber C., Leontovich A.M., Neuman B.W., Penzar D., Perlman S., Poon L.L.M., Samborskiy D.V., Sidorov I.A., Sola I., Ziebuhr J. - Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2 // *Nature Microbiology*. 2020. V. 5 (4). P. 536-544. doi: 10.1038/s41564-020-0695-z.

72. Guatelli J.C., Whitfield K.M., Kwok D.Y., Barringer K.J., Richman D.D., Gingeras T.R. Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990. V. 87. P. 1874-1878. doi: 10.1073/pnas.87.5.1874.
73. Gundy P.M., Gerba C.P., Pepper I.L. Survival of Coronaviruses in Water and Wastewater // *Food and Environmental Virology*. 2009. V. 1 (1). P. 10. doi: 10.1007/s12560-008-9001-6.
74. Hao W., Li M. Clinical diagnostic value of CT imaging in COVID-19 with multiple negative RT-PCR testing // *Travel Medicine and Infectious Disease*. 2020. 101627. doi: 10.1016/j.tmaid.2020.101627.
75. Hashemzadeh M.S., Rasouli R., Zahraei B., Izadi M., Tat M., Saadat S.H., Najarasl M., Khansari N.B., Dorostkar R. Development of Dual TaqMan Based One-Step rRT-PCR Assay Panel for Rapid and Accurate Diagnostic Test of MERS-CoV: A Novel Human Coronavirus, Ahead of Hajj Pilgrimage // *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 2016. V. 18 (11). e23874. doi: 10.5812/ircmj.23874.
76. Hecht L.S., Jurado-Jimenez A., Hess M., Halas H.E., Bochenek G., Mohammed H., Alzahrani F., Asiri M.O., Hasan R., Alamri A., Alotaibi S. Verification and diagnostic evaluation of the RealStar® Middle East respiratory syndrome coronavirus (N gene) reverse transcription-PCR kit 1.0 // *Future Microbiology*. 2019. V. 14. P. 941-948. doi: 10.2217/fmb-2019-0067.
77. Holland J, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S, VandePol S. Rapid evolution of RNA genomes // *Science*. 1982. V.215(4540). P.1577-1585. DOI: 10.1126/science.7041255.
78. Hong TC, Mai QL, Cuong DV, Parida M, Minekawa H, Notomi T, Hasebe F, Morita K. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus // *J Clin Microbiol*. 2004. V.42(5). P.1956-1961. DOI: 10.1128/jcm.42.5.1956-1961.2004
79. Hoteit R., Shammaa D., Mahfouz R. Use of the Human Coronavirus 2012 (MERS) GeneSig kit for MERS-CoV detection // *Gene Reports*. 2016. V. 4. P. 67-69. doi: 10.1016/j.genrep.2016.04.004.
80. Hou T., Zeng W., Yang M., Chen W., Ren L., Ai J., Wu J., Liao Y., Gou X., Li Y., Wang X., Su H., Gu B., Wang J., Xu T. Development and Evaluation of A CRISPR-based Diagnostic For 2019-novel Coronavirus // *medRxiv*. 2020. doi: 10.1101/2020.02.22.20025460.
81. Hu B., Zeng L.P., Yang X.L., Ge X.Y., Zhang W., Li B., Xie J.Z., Shen X.R., Zhang Y.Z., Wang N., Luo D.S., Zheng X.S., Wang M.N., Daszak P., Wang L.F., Cui J., Shi Z.L. Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus // *PLoS Pathogens*. 2017. V. 13 (11). e1006698. doi: 10.1371/journal.ppat.1006698.
82. Hu H., Jung K., Wang Q., Saif L.J., Vlasova A.N. Development of a one-step RT-PCR assay for detection of pancoronaviruses (α -, β -, γ -, and δ -coronaviruses) using newly designed degenerate primers for porcine and avian fecal samples // *Journal of Virology Methods*. 2018. V. 256. P. 116-122. doi: 10.1016/j.jviromet.2018.02.021.
83. Hu W., Bai B., Hu Z., Chen Z., An X., Tang L., Yang J., Wang H., Wang H. Development and evaluation of a multitarget real-time Taqman reverse transcription-PCR assay for detection of the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus and surveillance for an apparently related coronavirus found in masked palm civets // *Journal of Clinical Microbiology*. 2005. V. 43 (5). P. 2041-6. doi: 10.1128/JCM.43.5.2041-2046.2005.
84. Huang J.L., Lin H.T., Wang Y.M., Yeh Y.C., Peck K., Lin B.L., Liu H.W., Chen A., Lin C.S. Rapid and sensitive detection of multiple genes from the SARS-coronavirus using quantitative RT-PCR with dual systems // *Journal of Medical Virology*. 2005. V. 77 (2). P. 151-8. doi: 10.1002/jmv.20432.
85. Huang P., Wang H., Cao Z., Jin H., Chi H., Zhao J., Yu B., Yan F., Hu X., Wu F., Jiao C., Hou P., Xu S., Zhao Y., Feng N., Wang J., Sun W., Wang T., Gao Y., Yang S., Xia X. A Rapid and Specific Assay for the Detection of MERS-CoV // *Frontiers in Microbiology*. 2018. V. 9. 1101. doi: 10.3389/fmicb.2018.01101.
86. Huh H.J., Kim J.Y., Kwon H.J., Yun S.A., Lee M.K., Ki C.S., Lee N.Y., Kim J.W. Performance Evaluation of the PowerChek MERS (upE & ORF1a) Real-Time PCR Kit for the Detection of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus RNA // *Annals of Laboratory Medicine*. 2017. V. 37 (6). P. 494-498. doi: 10.3343/alm.2017.37.6.494.
87. Hulswit R.J., de Haan C.A., Bosch B.J. Coronavirus Spike Protein and Tropism Changes // *Advances in Virus Reserach*. 2016. V. 96. P. 29-57. doi: 10.1016/bs.aivir.2016.08.004.
88. Ji W., Wang W., Zhao X., Zai J., Li X. Cross-species transmission of the newly identified coronavirus 2019-nCoV // *Journal of Medical Virology*. 2020. V. 92 (4). P. 433-440. doi: 10.1002/jmv.25682.
89. Juang J.L., Chen T.C., Jiang S.S., Hsiung C.A., Chen W.C., Chen G.W., Lin S.M., Lin J.H., Chiu S.C., Lai Y.K. Coupling multiplex RT-PCR to a gene chip assay for sensitive and semiquantitative detection of severe acute respiratory syndrome-coronavirus // *Laboratory Investigation*. 2004. V. 84 (9). P. 1085-91. doi: 10.1038/labinvest.3700136.
90. Kampf G., Todt D., Pfaender S., Steinmann E. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents // *Journal of*

- Hospital Infection*. 2020. V. 104 (3). P. 246-251. doi: 10.1016/j.jhin.2020.01.022.
91. Kan B., Wang M., Jing H., Xu H., Jiang X., Yan M., Liang W., Zheng H., Wan K., Liu Q., Cui B., Xu Y., Zhang E., Wang H., Ye J., Li G., Li M., Cui Z., Qi X., Chen K., Du L., Gao K., Zhao Y.T., Zou X.Z., Feng Y.J., Gao Y.F., Hai R., Yu D., Guan Y., Xu J. Molecular evolution analysis and geographic investigation of severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in palm civets at an animal market and on farms // *Journal of Virology*. 2005. V. 79 (18). P. 11892-900. doi: 10.1128/JVI.79.18.11892-11900.2005.
 92. Keightley M.C., Sillekens P., Schippers W., Rinaldo C., George K.S. Real-time NASBA detection of SARS-associated coronavirus and comparison with real-time reverse transcription-PCR // *Journal of Medical Virology*. 2005. V. 77 (4). P. 602-8. doi: 10.1002/jmv.20498.
 93. Kim J.M., Chung Y.S., Jo H.J., Lee N.J., Kim M.S., Woo S.H., Park S., Kim J.W., Kim H.M., Han M.G. Identification of Coronavirus Isolated from a Patient in Korea with COVID-19 // *Osong Public Health and Research Perspectives*. 2020. V. 11 (1). P. 3-7. doi: 10.24171/j.phrp.2020.11.1.02.
 94. Kim M.N., Ko Y.J., Seong M.W., Kim J.S., Shin B.M., Sung H. Analytical and Clinical Validation of Six Commercial Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus RNA Detection Kits Based on Real-Time Reverse-Transcription PCR // *Annals of Laboratory Medicine*. 2016. V. 36 (5). P. 450-6. doi: 10.3343/alm.2016.36.5.450.
 95. Kim S.H., Chang S.Y., Sung M., Park J.H., Bin Kim H., Lee H., Choi J.P., Choi W.S., Min J.Y. Extensive Viable Middle East Respiratory Syndrome (MERS) Coronavirus Contamination in Air and Surrounding Environment in MERS Isolation Wards // *Clinical Infectious Diseases*. 2016. V. 63 (3). P. 363-9. doi: 10.1093/cid/ciw239.
 96. Kirchdoerfer R.N., Ward A.B. Structure of the SARS-CoV nsp12 polymerase bound to nsp7 and nsp8 co-factors // *Nature Communications*. 2019. V. 10 (1). P. 2342. doi: 10.1038/s41467-019-10280-3.
 97. Kivistö I., Tidenberg E.M., Lilley T., Suominen K., Forbes K.M., Vapalahti O., Huovilainen A., Sironen T. First Report of Coronaviruses in Northern European Bats // *Vector Borne Zoonotic Diseases*. 2020. V. 20 (2). P. 155-158. doi: 10.1089/vbz.2018.2367.
 98. Korea Centers for Disease Control and Prevention. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Outbreak in the Republic of Korea, 2015 // *Osong Public Health Res Perspect*. 2015. V.6(4). P.269-278. doi: 10.1016/j.phrp.2015.08.006.
 99. Kumar S, Maurya VK, Prasad AK, Bhatt MLB, Saxena SK. Structural, glycosylation and antigenic variation between 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) and SARS coronavirus (SARS-CoV) // *Virusdisease*. 2020. V.31(1). P.13-21. doi: 10.1007/s13337-020-00571-5.
 100. Kurup V.M., Thomas J. Edible vaccines: Promises and challenges // *Molecular Biotechnology*. 2020. V.62 (2). P. 79-90. doi: 10.1007/s12033-019-00222-1.
 101. Kwok D.Y., Davis G.R., Whitfield K.M., Chappelle H.L., DiMichele L.J., Gingeras T.R. Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989. V. 86 (4). P. 1173-7. doi: 10.1073/pnas.86.4.1173.
 102. Lai M.Y., Cheng P.K., Lim W.W. Survival of severe acute respiratory syndrome coronavirus // *Clinical Infectious Diseases*. 2005. V. 41 (7). e67-71. doi: 10.1086/433186.
 103. Lam T.T., Shum M.H., Zhu H.C., Tong Y.G., Ni X.B., Liao Y.S., Wei W., Cheung W.Y., Li W.J., Li L.F., Leung G.M., Holmes E.C., Hu Y.L., Guan Y. Identifying SARS-CoV-2 related coronaviruses in Malayan pangolins // *Nature*. 2020. doi: 10.1038/s41586-020-2169-0.
 104. Lan J., Ge J., Yu J., Shan S., Zhou H., Fan S., Zhang Q., Shi X., Wang Q., Zhang L., Wang X. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor // *Nature*. 2020. doi: 10.1038/s41586-020-2180-5.
 105. Lau L.T., Fung Y.W., Wong F.P., Lin S.S., Wang C.R., Li H.L., Dillon N., Collins R.A., Tam J.S., Chan P.K., Wang C.G., Yu A.C. A real-time PCR for SARS-coronavirus incorporating target gene pre-amplification // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003. V. 312 (4). P. 1290-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.11.064.
 106. Lau S.K., Woo P.C., Li K.S., Huang Y., Tsoi H.W., Wong B.H., Wong S.S., Leung S.Y., Chan K.H., Yuen K.Y. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102 (39). P. 14040-5. doi: 10.1073/pnas.0506735102.
 107. Lee M, Seo D.J., Seo J., Oh H., Jeon S.B., Ha S.D., Myoung J., Choi I.S., Choi C. Detection of viable murine norovirus using the plaque assay and propidium-monoazide-combined real-time reverse transcription-polymerase chain reaction // *Journal of Virology Methods*. 2015. V. 221. P. 57-61. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.04.018.
 108. Lee SH, Baek YH, Kim YH, Choi YK, Song MS, Ahn JY. One-Pot Reverse Transcriptional Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for Detecting MERS-CoV // *Front Microbiol*. 2017. V.7. 2166. doi: 10.3389/fmicb.2016.02166.

109. Lefkowitz E.J., Dempsey D.M., Hendrickson R.C., Orton R.J., Siddell S.G., Smith D.B. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) // *Nucleic Acids Research*. 2018. V. 46. P. D708-D717. doi: 10.1093/nar/gkx932.
110. Leifels M., Jurzik L., Wilhelm M., Hamza I.A. Use of ethidium monoazide and propidium monoazide to determine viral infectivity upon inactivation by heat, UV- exposure and chlorine // *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2015. V. 218 (8). P. 686-93. doi: 10.1016/j.ijheh.2015.02.003. Erratum in: *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2016. V. 219 (2). P. 232.
111. Li D., Wang D., Dong J., Wang N., Huang H., Xu H., Xia C. False-Negative Results of Real-Time Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2: Role of Deep-Learning-Based CT Diagnosis and Insights from Two Cases // *Korean Journal of Radiology*. 2020. V. 21 (4). P. 505-508. doi: 10.3348/kjr.2020.0146.
112. Li W., Moore M.J., Vasilieva N., Sui J., Wong S.K., Berne M.A., Somasundaram M., Sullivan J.L., Luzuriaga K., Greenough T.C., Choe H., Farzan M. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus // *Nature*. 2003. V. 426 (6965). P. 450-4.
113. Li W., Shi Z., Yu M., Ren W., Smith C., Epstein J.H., Wang H., Cramer G., Hu Z., Zhang H., Zhang J., McEachern J., Field H., Daszak P., Eaton B.T., Zhang S., Wang L.F. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses // *Science*. 2005. V. 310 (5748). P. 676-9. doi: 10.1126/science.1118391.
114. Liu L., Wang T., Lu J. The prevalence, origin, and prevention of six human coronaviruses // *Virologica Sinica*. 2016. V. 31 (1). P. 94-9. doi: 10.1007/s12250-015-3687-z.
115. Liu R., Han H., Liu F., Lv Z., Wu K., Liu Y., Feng Y., Zhu C. Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020 // *Clinica Chimica Acta*. 2020. V. 505. P. 172-175. doi: 10.1016/j.cca.2020.03.009.
116. Liu S.L., Saif L.J., Weiss S.R., Su L. No credible evidence supporting claims of the laboratory engineering of SARS-CoV-2 // *Emerging Microbes Infection*. 2020. V. 9 (1). P. 505-507. doi: 10.1080/22221751.2020.1733440.
117. Liu Z., Xiao X., Wei X., Li J., Yang J., Tan H., Zhu J., Zhang Q., Wu J., Liu L. Composition and divergence of coronavirus spike proteins and host ACE2 receptors predict potential intermediate hosts of SARS-CoV-2 // *Journal of Medical Virology*. 2020. doi: 10.1002/jmv.25726.
118. Lodder W., de Roda Husman A.M. SARS-CoV-2 in Wastewater: Potential Health Risk, but Also Data Source // *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*. 2020. S2468-1253(20)30087-X. doi: 10.1016/S2468-1253(20)30087-X.
119. Long C., Xu H., Shen Q., Zhang X., Fan B., Wang C., Zeng B., Li Z., Li X., Li H. Diagnosis of the Coronavirus disease (COVID-19): rRT-PCR or CT? // *European Journal of Radiology*. 2020. V. 126. P. 108961. doi: 10.1016/j.ejrad.2020.108961.
120. Lu H., Zhao Y., Zhang J., Wang Y., Li W., Zhu X., Sun S., Xu J., Ling L., Cai L., Bu D., Chen R. Date of origin of the SARS coronavirus strains // *BMC Infectious Disease*. 2004. V. 4. P. 3. doi: 10.1186/1471-2334-4-3.
121. Lu R., Wu X., Wan Z., Li Y., Zuo L., Qin J., Jin X., Zhang C. Development of a Novel Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of SARS-CoV-2 // *Virologica Sinica*. 2020. doi: 10.1007/s12250-020-00218-1.
122. Lu R., Yu X., Wang W., Duan X., Zhang L., Zhou W., Xu J., Xu L., Hu Q., Lu J., Ruan L., Wang Z., Tan W. Characterization of human coronavirus etiology in Chinese adults with acute upper respiratory tract infection by real-time RT-PCR assays // *PLoS One*. 2012. V. 7 (6). e38638. doi: 10.1371/journal.pone.0038638.
123. Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., Wang W., Song H., Huang B., Zhu N., Bi Y., Ma X., Zhan F., Wang L., Hu T., Zhou H., Hu Z., Zhou W., Zhao L., Chen J., Meng Y., Wang J., Lin Y., Yuan J., Xie Z., Ma J., Liu W.J., Wang D., Xu W., Holmes E.C., Gao G.F., Wu G., Chen W., Shi W., Tan W. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding // *The Lancet*. 2020. V. 395 (10224). P. 565-574. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
124. Lu X., Whitaker B., Sakthivel S.K., Kamili S., Rose L.E., Lowe L., Mohareb E., Ellassal E.M., Al-sanouri T., Haddadin A., Erdman D.D. Real-time reverse transcription-PCR assay panel for Middle East respiratory syndrome coronavirus // *Journal of Clinical Microbiology*. 2014. V. 52 (1). P. 67-75. doi: 10.1128/JCM.02533-13.
125. Luk H.K.H., Li X., Fung J., Lau S.K.P., Woo P.C.Y. Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of SARS coronavirus // *Infection, Genetics and Evolution*. 2019. V. 71. P. 21-30. doi: 10.1016/j.meegid.2019.03.001.
126. Mallapaty S. How sewage could reveal true scale of coronavirus outbreak // *Nature*. 2020. V. 580 (7802). P. 176-177. doi: 10.1038/d41586-020-00973-x.
127. Marra M.A., Jones S.J., Astell C.R., Holt R.A., Brooks-Wilson A., Butterfield Y.S., Khattra J., Asano J.K., Barber S.A., Chan S.Y., Cloutier A., Coughlin

- S.M., Freeman D., Girn N., Griffith O.L., Leach S.R., Mayo M., McDonald H, Montgomery SB, Pandoh PK, Petrescu AS, Robertson AG, Schein JE, Siddiqui A, Smailus DE, Stott J.M., Yang G.S., Plummer F., Andonov A., Artsob H., Bastien N., Bernard K., Booth T.F., Bowness D., Czub M., Drebot M., Fernando L., Flick R., Garbutt M., Gray M., Grolla A., Jones S., Feldmann H., Meyers A., Kabani A., Li Y., Normand S., Stroher U., Tipples G.A., Tyler S., Vogrig R., Ward D., Watson B., Brunham R.C., Kraiden M., Petric M., Skowronski D.M., Upton C., Roper R.L. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus // *Science*. 2003. V. 300 (5624). P. 1399-404. doi: 10.1126/science.1085953.
128. Martin J.E., Louder M.K., Holman L.A., Gordon I.J., Enama M.E., Larkin B.D., Andrews C.A., Vogel L., Koup R.A., Roederer M., Bailer R.T., Gomez P.L., Nason M., Mascola J.R., Nabel G.J., Graham B.S. A SARS DNA vaccine induces neutralizing antibody and cellular immune responses in healthy adults in a Phase I clinical trial // *Vaccine*. 2008. V. 26 (50). P. 6338-43. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.09.026.
129. Medema G., Heijnen L., Elsinga G., Italiaander R. Presence of SARS-Coronavirus-2 in sewage // *medRxiv preprint*. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.29.20045880>.
130. Menachery V.D., Yount B.L. Jr., Debbink K., Agnihothram S., Gralinski L.E., Plante J.A., Graham R.L., Scobey T., Ge X.Y., Donaldson E.F., Randell S.H., Lanzavecchia A., Marasco W.A., Shi Z.L., Baric R.S. A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence // *Nature Medicine*. 2015. V. 21 (12). P. 1508-13. doi: 10.1038/nm.3985.
131. Minskaia E., Hertzog T., Gorbalenya A.E., Campanacci V., Cambillau C., Canard B., Ziebuhr J. Discovery of an RNA virus 3'->5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103 (13). P. 5108-13. doi: 10.1073/pnas.0508200103.
132. Mitani Y., Lezhava A., Kawai Y., Kikuchi T, Oguchi-Katayama A, Kogo Y, Itoh M, Miyagi T, Takakura H, Hoshi K, Kato C, Arakawa T, Shibata K, Fukui K, Masui R, Kuramitsu S, Kiyotani K, Chalk A, Tsunekawa K, Murakami M, Kamataki T, Oka T, Shimada H, Cizdziel PE, Hayashizaki Y. Rapid SNP diagnostics using asymmetric isothermal amplification and a new mismatch-suppression technology // *Nat. Methods*. 2007. V.4(3). P.257-262. DOI: 10.1038/nmeth1007.
133. Modjarrad K., Roberts C.C., Mills K.T., Castellano A.R., Paolino K., Muthumani K., Reuschel E.L., Robb M.L., Racine T., Oh M.D., Lamarre C., Zaidi F.I., Boyer J., Kudchodkar S.B., Jeong M., Darden J.M., Park Y.K., Scott P.T., Remigio C., Parikh A.P., Wise M.C., Patel A., Duperret E.K., Kim K.Y., Choi H., White S., Bagarazzi M., May J.M., Kane D., Lee H., Kobinger G., Michael N.L., Weiner D.B., Thomas S.J., Maslow J.N. Safety and immunogenicity of an anti-Middle East respiratory syndrome coronavirus DNA vaccine: a phase 1, open-label, single-arm, dose-escalation trial // *The Lancet Infectious Disease*. 2019. V. 19 (9). P. 1013-1022. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30266-X.
134. Mohamed D.H., Al-Hetheel A.F., Mohamud H.S., Aldosari K., Alzamil F.A., Somily A.M. Clinical validation of 3 commercial real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction assays for the detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus from upper respiratory tract specimens // *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*. 2017. V. 87 (4). P. 320-324. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.01.003.
135. Moreno A., Lelli D., de Sabato L., Zaccaria G., Boni A., Sozzi E., Prosperi A., Lavazza A., Cella E., Castrucci M.R., Ciccozzi M., Vaccari G. Detection and full genome characterization of two beta CoV viruses related to Middle East respiratory syndrome from bats in Italy // *Virology Journal*. 2017. V. 14 (1). P. 239. doi: 10.1186/s12985-017-0907-1.
136. Muth D, Corman VM, Roth H, Binger T, Dijkman R, Gottula LT, Gloza-Rausch F, Balboni A, Battilani M, Rihtarić D, Toplak I, Ameneiros RS, Pfeifer A, Thiel V, Drexler JF, Müller MA, Drosten C. Attenuation of replication by a 29 nucleotide deletion in SARS-coronavirus acquired during the early stages of human-to-human transmission // *Sci Rep*. 2018. V.8(1). 15177. DOI: 10.1038/s41598-018-33487-8.
137. Muthumani K., Falzarano D., Reuschel E.L., Tingey C., Flingai S., Villarreal D.O., Wise M., Patel A., Izmirlly A., Aljuaid A., Seliga A.M., Soule G., Morrow M., Kraynyak K.A., Khan A.S., Scott D.P., Feldmann F., LaCasse R., Meade-White K., Okumura A., Ugen K.E., Sardesai N.Y., Kim J.J., Kobinger G., Feldmann H., Weiner D.B. A synthetic consensus anti-spike protein DNA vaccine induces protective immunity against Middle East respiratory syndrome coronavirus in nonhuman primates // *Science Translational Medicine*. 2015. V. 7 (301). P. 301ra132. doi: 10.1126/scitranslmed.aac7462.
138. Ng O.W., Tan Y.J. Understanding bat SARS-like coronaviruses for the preparation of future coronavirus outbreaks - Implications for coronavirus vaccine development // *Human Vaccine Immunotherapy*. 2017. V.13(1). P.186-189. doi: 10.1080/21645515.2016.1228500.
139. Nguyen T., Duong Bang D., Wolff A. 2019 Novel Coronavirus Disease (COVID-19): Paving the Road for Rapid Detection and Point-of-Care Diagnostics // *Micromachines (Basel)*. 2020. V. 11 (3). pii: E306. doi: 10.3390/mi11030306.

140. Niu P., Shen J., Zhu N., Lu R., Tan W. Two-tube multiplex real-time reverse transcription PCR to detect six human coronaviruses // *Virologica Sinica*. 2016. V. 31 (1). P. 85-8. doi: 10.1007/s12250-015-3653-9.
141. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA // *Nucleic Acids Res*. 2000. V.28(12). E63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63.
142. Ogando NS, Ferron F, Decroly E, Canard B, Posthuma CC, Snijder EJ. The Curious Case of the Nidovirus Exoribonuclease: Its Role in RNA Synthesis and Replication Fidelity // *Front Microbiol*. 2019. V.10. 1813. doi: 10.3389/fmicb.2019.01813.
143. Okada P., Buathong R., Phuygun S., Thanadachakul T., Parnmen S., Wongboot W., Waicharoen S., Wacharapluesadee S., Uttayamakul S., Vachiraphan A., Chittaganpitch M., Mekha N., Janejai N., Iamsirithaworn S., Lee R.T., Maurer-Stroh S. Early transmission patterns of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in travellers from Wuhan to Thailand, January 2020 // *Euro Surveillance*. 2020, V. 25 (8). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.8.2000097.
144. Onishchenko G.G., Govorun V.M., Sergienko V.I., Akopian T.A., Momynaliev K.T., Vereshchagin V.A., Lazarev V.N., Vasilev N.T., Markov V.I., Merkulov V.A., Maksimov V.A., Melnikov V.A., Lopukhin Y.M. Structural organization of the genome of SARS-associated coronavirus (Strain SoD) isolated on the territory of the Russian Federation // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2004. V. 137 (2). P. 197-9. doi: 10.1023/b:bebm.0000028139.02582.97.
145. Oristo S., Lee H.J., Maunula L. Performance of pre-RT-qPCR treatments to discriminate infectious human rotaviruses and noroviruses from heat-inactivated viruses: applications of PMA/PMAxx, benzonase and RNase // *Journal of Applied Microbiology*. 2018. V. 124 (4). p. 1008-1016. doi: 10.1111/jam.13737.
146. Ortega J.T., Serrano M.L., Pujol F.H., Rangel H.R. Role of changes in SARS-CoV-2 spike protein in the interaction with the human ACE2 receptor: An in silico analysis // *EXCLI Journal*. 2020. V. 19. P. 410-417. doi: 10.17179/excli2020-1167.
147. Paraskevis D., Kostaki E.G., Magiorkinis G., Panayiotakopoulos G., Sourvinos G., Tsiodras S. Full-genome evolutionary analysis of the novel corona virus (2019-nCoV) rejects the hypothesis of emergence as a result of a recent recombination event // *Infection, Genetics and Evolution*. 2020. V. 79. P. 104212. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104212.
148. Parshionikar S., Laseke I., Fout G.S. Use of propidium monoazide in reverse transcriptase PCR to distinguish between infectious and noninfectious enteric viruses in water samples // *Applied Environmental Microbiology*. 2010. V. 76 (13). P. 4318-26. doi: 10.1128/AEM.02800-09.
149. Pas S.D., Patel P., Reusken C., Domingo C., Corman V.M., Drosten C., Dijkman R., Thiel V., Nowotny N., Koopmans M.P., Niedrig M. First international external quality assessment of molecular diagnostics for Mers-CoV // *Journal of Clinical Virology*. 2015. V. 69. P. 81-5. doi: 10.1016/j.jcv.2015.05.022.
150. Peiris J.S., Lai S.T., Poon L.L., Guan Y., Yam L.Y., Lim W., Nicholls J., Yee W.K., Yan W.W., Cheung M.T., Cheng V.C., Chan K.H., Tsang D.N., Yung R.W., Ng T.K., Yuen K.Y. SARS study group. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome // *The Lancet*. 2003. V. 361 (9366). P. 1319-25. doi: 10.1016/s0140-6736(03)13077-2.
151. Petrushina I., Hovakimyan A., Harahap-Carrillo I.S., Davtyan H., Antonyan T., Chailyan G., Kazarian K., Antonenko M., Jullienne A., Hamer M.M., Obenaus A., King O., Zagorski K., Blurton-Jones M., Cribbs D.H., Lander H., Ghochikyan A., Agadjanyan M.G. Characterization and preclinical evaluation of the cGMP grade DNA based vaccine, AV-1959D to enter the first-in-human clinical trials // *Neurobiology Diseases*. 2020. V. 139. 104823. doi: 10.1016/j.nbd.2020.104823.
152. Pfefferle S., Reucher S., Nörz D., Lütgehetmann M. Evaluation of a quantitative RT-PCR assay for the detection of the emerging coronavirus SARS-CoV-2 using a high throughput system // *Euro Surveillance*. 2020. V. 25 (9). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.9.2000152.
153. Pogrebnyak N., Golovkin M., Andrianov V., Spitsin S., Smirnov Y., Egolf R., Koprowski H. Severe acute respiratory syndrome (SARS) S protein production in plants: development of recombinant vaccine // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102 (25). P. 9062-7. doi: 10.1073/pnas.0503760102.
154. Poon L.L., Chan K.H., Wong O.K., Cheung T.K., Ng I., Zheng B., Seto W.H., Yuen K.Y., Guan Y., Peiris J.S. Detection of SARS coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome by conventional and real-time quantitative reverse transcription-PCR assays // *Clinical Chemistry*. 2004. V. 50 (1). P. 67-72. doi: 10.1373/clinchem.2003.023663.
155. Poon L.L., Chan K.H., Wong O.K., Yam W.C., Yuen K.Y., Guan Y., Lo Y.M., Peiris J.S. Early diagnosis of SARS coronavirus infection by real time RT-PCR // *Journal of Clinical Virology*. 2003. V. 28 (3). P. 233-8. doi: 10.1016/j.jcv.2003.08.004
156. Poon L.L., Wong B.W., Chan K.H., Leung C.S., Yuen K.Y., Guan Y., Peiris J.S. A one step quantitative RT-PCR for detection of SARS coronavirus with an internal control for PCR inhibitors // *Journal of Clinical Virology*. 2004a. V. 30 (3). P. 214-7. doi: 10.1016/j.jcv.2003.12.007.

157. Poon L.L., Wong B.W., Chan K.H., Ng S.S., Yuen K.Y., Guan Y., Peiris J.S. Evaluation of real-time reverse transcriptase PCR and real-time loop-mediated amplification assays for severe acute respiratory syndrome coronavirus detection // *Journal of Clinical Microbiology*. 2005. V. 43 (7). P. 3457-9. doi: 10.1128/JCM.43.7.3457-3459.2005.
158. Pyankov O.V., Bodnev S.A., Pyankova O.G., Agranovski I.E. Survival of aerosolized coronavirus in the ambient air // *Journal of Aerosol Science*. 2018. V. 115. P. 158-163. doi: 10.1016/j.jaerosci.2017.09.009.
159. Qinfen Z., Jinming C., Xiaojun H., Huanying Z., Jicheng H., Ling F., Kunpeng L., Jingqiang Z. The life cycle of SARS coronavirus in Vero E6 cells // *Journal of Medical Virology*. 2004. V. 73 (3). P. 332-7. doi: 10.1002/jmv.20095.
160. Qiu Y., Zhao Y.B., Wang Q., Li J.Y., Zhou Z.J., Liao C.H., Ge X.Y. Predicting the angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) utilizing capability as the receptor of SARS-CoV-2 // *Microbes Infections*. 2020. pii: S1286-4579(20)30049-6. doi: 10.1016/j.micinf.2020.03.003.
161. Qu X.X., Hao P., Song X.J., Jiang S.M., Liu Y.X., Wang P.G., Rao X., Song H.D., Wang S.Y., Zuo Y., Zheng A.H., Luo M., Wang H.L., Deng F., Wang H.Z., Hu Z.H., Ding M.X., Zhao G.P., Deng H.K. Identification of two critical amino acid residues of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for its variation in zoonotic tropism transition via a double substitution strategy // *Journal of Biological Chemistry*. 2005. V. 280 (33). P. 29588-95.
162. Quijada N.M., Fongaro G., Barardi C.R., Hernández M., Rodríguez-Lázaro D. Propidium Monoazide Integrated with qPCR Enables the Detection and Enumeration of Infectious Enteric RNA and DNA Viruses in Clam and Fermented Sausages // *Frontiers in Microbiology*. 2016. V. 7. P. 2008. doi: 10.3389/fmicb.2016.02008.
163. Rabenau H.F., Cinatl J., Morgenstern B., Bauer G., Preiser W., Doerr H.W. Stability and inactivation of SARS coronavirus // *Medical Microbiology and Immunology*. 2005. V. 194 (1-2). P. 1-6.
164. Rota P.A., Oberste M.S., Monroe S.S., Nix W.A., Campagnoli R., Icenogle J.P., Peñaranda S., Bankamp B., Maher K., Chen M.H., Tong S., Tamin A., Lowe L., Frace M., DeRisi J.L., Chen Q., Wang D., Erdman D.D., Peret T.C., Burns C., Ksiazek T.G., Rollin P.E., Sanchez A., Liffick S., Holloway B., Limor J., McCaustland K., Olsen-Rasmussen M., Fouchier R., Günther S., Osterhaus A.D., Drosten C., Pallansch M.A., Anderson L.J., Bellini W.J. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome // *Science*. 2003. V. 300 (5624). P. 1394-9. doi: 10.1126/science.1085952.
165. Rutschke N., Zimmermann J., Möller R., Klöck G., Winterhalter M., Leune A. Hot start reverse transcriptase: an approach for improved real-time RT-PCR performance // *J. Anal. Sci. Technol.* 2015. V. 6 (1). P. 20. doi: 10.1186/s40543-015-0063-4.
166. Rybicki E.P. Plant molecular farming of virus-like nanoparticles as vaccines and reagents // *Wiley Interdisciplinary Reviews Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2020. V. 12 (2). e1587. doi: 10.1002/wnan.1587.
167. Sanjuán R, Nebot MR, Chirico N, Mansky LM, Belshaw R. Viral mutation rates // *J Virol*. 2010. V. 84(19). P.9733-9748. DOI: 10.1128/JVI.00694-10.
168. Scobey T., Yount B.L., Sims A.C., Donaldson E.F., Agnihothram S.S., Menachery V.D., Graham R.L., Swanstrom J., Bove P.F., Kim J.D., Grego S., Randell S.H., Baric R.S. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of the Middle East respiratory syndrome coronavirus // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110 (40). P. 16157-62. doi: 10.1073/pnas.1311542110.
169. Scotti N., Rybicki E.P. Virus-like particles produced in plants as potential vaccines // *Expert Reviews of Vaccines*. 2013. V. 12 (2). P. 211-24. doi: 10.1586/erv.12.147.
170. Seong M.W., Kim S.Y., Corman V.M., Kim T.S., Cho S.I., Kim M.J., Lee S.J., Lee J.S., Seo S.H., Ahn J.S., Yu B.S., Park N., Oh M.D., Park W.B., Lee J.Y., Kim G., Joh J.S., Jeong I., Kim E.C., Drosten C., Park S.S. Microevolution of Outbreak-Associated Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus, South Korea, 2015 // *Emerging Infectious Diseases*. 2016. V. 22 (2). P. 327-30. doi: 10.3201/eid2202.151700.
171. Sevajol M., Subissi L., Decroly E., Canard B., Imbert I. Insights into RNA synthesis, capping, and proofreading mechanisms of SARS-coronavirus // *Virus Research*. 2014. V. 194. P. 90-9. doi: 10.1016/j.virusres.2014.10.008.
172. Shang J., Ye G., Shi K., Wan Y., Luo C., Aihara H., Geng Q., Auerbach A., Li F. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2 // *Nature*. 2020. doi: 10.1038/s41586-020-2179-y.
173. Sheahan T.P., Baric R.S. Is regulation preventing the development of therapeutics that may prevent future coronavirus pandemics? // *Future Virology*. 2018. V. 13 (3). P. 143-146. doi: 10.2217/fvl-2017-0143.
174. Sheridan C. Coronavirus and the race to distribute reliable diagnostics // *Nat Biotechnol*. 2020. V.38(4). P.382-384. DOI: 10.1038/d41587-020-00002-2.
175. Shi R., Ma W., Wu Q., Zhang B., Song Y., Guo Q., Xiao W., Wang Y., Zheng W. Design and application of 60mer oligonucleotide microarray in SARS coronavirus detection // *Chinese Scientific Bulletin*. 2003. V. 48 (12). P. 1165-1169. doi: 10.1007/BF03183928.
176. Shirato K., Nao N., Matsuyama S., Kageyama T. An ultra-rapid real-time RT-PCR method for detecting

- Middle East respiratory syndrome coronavirus using a mobile PCR device, PCR1100 // *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2019. doi: 10.7883/yoken.JJID.2019.400.
177. Shirato K., Yano T., Senba S., Akachi S., Kobayashi T., Nishinaka T., Notomi T., Matsuyama S. Detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) // *Virology Journal*. 2014. V. 11. P. 139. doi: 10.1186/1743-422X-11-139.
178. Sohrab S.S., Suhail M., Kamal M.A., Husen A., Azhar E.I. Recent development and future prospects of plant-based vaccines // *Current Drug Metabolism*. 2017. V. 18 (9). P. 831-841. doi: 10.2174/1389200218666170711121810.
179. Song H.D., Tu C.C., Zhang G.W., Wang S.Y., Zheng K., Lei L.C., Chen Q.X., Gao Y.W., Zhou H.Q., Xiang H., Zheng H.J., Chern S.W., Cheng F., Pan C.M., Xuan H., Chen S.J., Luo H.M., Zhou D.H., Liu Y.F., He J.F., Qin P.Z., Li L.H., Ren Y.Q., Liang W.J., Yu Y.D., Anderson L., Wang M., Xu R.H., Wu X.W., Zheng H.Y., Chen J.D., Liang G., Gao Y., Liao M., Fang L., Jiang L.Y., Li H., Chen F., Di B., He L.J., Lin J.Y., Tong S., Kong X., Du L., Hao P., Tang H., Bernini A., Yu X.J., Spiga O., Guo Z.M., Pan H.Y., He W.Z., Manuguerra J.C., Fontanet A., Danchin A., Niccolai N., Li Y.X., Wu C.I., Zhao G.P. Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102 (7). P. 2430-5. doi: 10.1073/pnas.0409608102.
180. Su YCF, Anderson DE, Young BE, Zhu F, Linster M, Kalimuddin S., Low JGH, Yan Z, Jayakumar J, Sun L, Yan GZ, Mendenhall IH, Leo Y.-S., Lye DC, Wang L-F., Smith GJD. Discovery of a 382-nt deletion during the early evolution of SARS-CoV-2 // *bioRxiv*. 2020 DOI: 10.1101/2020.03.11.987222.
181. Subissi L, Posthuma CC, Collet A, Zevenhoven-Dobbe JC, Gorbalenya AE, Decroly E, Snijder EJ, Canard B, Imbert I. One severe acute respiratory syndrome coronavirus protein complex integrates processive RNA polymerase and exonuclease activities // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014. V.111(37). E3900-9. DOI: 10.1073/pnas.1323705111.
182. te Velthuis A.J., Arnold J.J., Cameron C.E., van den Worm S.H., Snijder E.J. The RNA polymerase activity of SARS-coronavirus nsp12 is primer dependent // *Nucleic Acids Research*. 2010. V. 38 (1). P. 203-14. doi: 10.1093/nar/gkp904.
183. The Chinese SARS Molecular Epidemiology Consortium. Molecular evolution of the SARS coronavirus during the course of the SARS epidemic in China // *Science*. 2004. V.303(5664). P.1666-1669. DOI: 10.1126/science.1092002.
184. Tong S., Conrardy C., Ruone S., Kuzmin I.V., Guo X., Tao Y., Niezgoda M., Haynes L., Agwanda B., Breiman R.F., Anderson L.J., Rupprecht C.E. Detection of novel SARS-like and other coronaviruses in bats from Kenya // *Emerging Infectious Diseases*. 2009. V. 15 (3). P. 482-5. doi: 10.3201/eid1503.081013.
185. Tsui SK, Chim SS, Lo YM; Chinese University of Hong Kong Molecular SARS Research Group. Coronavirus genomic-sequence variations and the epidemiology of the severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*. 2003. V.349(2). P.187-188. DOI: 10.1056/NEJM200307103490216.
186. van Boheemen S., de Graaf M., Lauber C., Bestebroer T.M., Raj V.S., Zaki A.M., Osterhaus A.D., Haagmans B.L., Gorbalenya A.E., Snijder E.J., Fouchier R.A. Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans // *mBio*. 2012. V. 3 (6). pii: e00473-12. doi: 10.1128/mBio.00473-12.
187. van Doremalen N., Bushmaker T., Morris D.H., Holbrook M.G., Gamble A., Williamson B.N., Tamin A., Harcourt J.L., Thornburg N.J., Gerber S.I., Lloyd-Smith J.O., de Wit E., Munster V.J. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1 // *New England Journal of Medicine*. 2020. V. 382 (16). P. 1564-1567. doi: 10.1056/NEJMc2004973.
188. van Doremalen N., Bushmaker T., Munster V.J. Stability of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) under different environmental conditions // *Euro Surveillance*. 2013. V. 18 (38). pii: 20590. doi: 10.2807/1560-7917.es2013.18.38.20590.
189. Vijgen L., Moës E., Keyaerts E., Li S., Van Ranst M. A pan-coronavirus RT-PCR assay for detection of all known coronaviruses // *Methods in Molecular Biology*. 2008. V. 454. P. 3-12. doi: 10.1007/978-1-59745-181-9_1.
190. Walker P.J., Siddell S.G., Lefkowitz E.J., Mushegian A.R., Dempsey D.M., Dutilh B.E., Harrach B., Harrison R.L., Hendrickson R.C., Junglen S., Knowles N.J., Kropinski A.M., Krupovic M., Kuhn J.H., Nibert M., Rubino L., Sabanadzovic S., Simmonds P., Varsani A., Zerbini F.M., Davison A.J. Changes to virus taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2019) // *Archives of Virology*. 2019. V. 164 (9). P. 2417-2429. doi: 10.1007/s00705-019-04306-w.
191. Wang B., Potter S.J., Lin Y., Cunningham A.L., Dwyer D.E., Su Y., Ma X., Hou Y., Saksena N.K. Rapid and sensitive detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by rolling circle amplification // *Journal of Clinical Microbiology*. 2005. V. 43 (5). P. 2339-44. doi: 10.1128/JCM.43.5.2339-2344.2005.

192. Wang C., Liu Z., Chen Z., Huang X., Xu M., He T., Zhang Z. The establishment of reference sequence for SARS-CoV-2 and variation analysis // *Journal of Medical Virology*. 2020. V. doi: 10.1002/jmv.25762.
193. Wang L., Fu S., Cao Y., Zhang H., Feng Y., Yang W., Nie K., Ma X., Liang G. Discovery and genetic analysis of novel coronaviruses in least horseshoe bats in southwestern China // *Emerging Microbes and Infections*. 2017. V. 6 (3). e14. doi: 10.1038/emi.2016.140.
194. Wang X.W., Li J., Guo T., Zhen B., Kong Q., Yi B., Li Z., Song N., Jin M., Xiao W., Zhu X., Gu C., Yin J., Wei W., Yao W., Liu C., Li J., Ou G., Wang M., Fang T., Wang G., Qiu Y., Wu H., Chao F., Li J. Concentration and detection of SARS coronavirus in sewage from Xiao Tang Shan Hospital and the 309th Hospital of the Chinese People's Liberation Army // *Water Science and Technology*. 2005. V. 52 (8). P. 213-21. doi: 10.2166/wst.2005.0266
195. Wölfel R., Corman V.M., Guggemos W., Seilmaier M., Zange S., Müller M.A., Niemeyer D., Jones T.C., Vollmar P., Rothe C., Hoelscher M., Bleicker T., Brünink S., Schneider J., Ehmann R., Zwirgmaier K., Drosten C., Wendtner C. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019 // *Nature*. 2020. doi: 10.1038/s41586-020-2196-x.
196. Woo P.C., Lau S.K., Tsoi H.W., Chen Z.W., Wong B.H., Zhang L., Chan J.K., Wong L.P., He W., Ma C., Chan K.H., Ho D.D., Yuen K.Y. SARS coronavirus spike polypeptide DNA vaccine priming with recombinant spike polypeptide from *Escherichia coli* as booster induces high titer of neutralizing antibody against SARS coronavirus // *Vaccine*. 2005. V. 23 (42). P. 4959-68. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.05.023.
197. Wrapp D., Wang N., Corbett K.S., Goldsmith J.A., Hsieh C.L., Abiona O., Graham B.S., McLellan J.S. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation // *Science*. 2020. V. 367 (6483). P. 1260-1263. doi: 10.1126/science.abb2507.
198. Wu F., Zhao S., Yu B., Chen Y.M., Wang W., Song Z.G., Hu Y., Tao Z.W., Tian J.H., Pei Y.Y., Yuan M.L., Zhang Y.L., Dai F.H., Liu Y., Wang Q.M., Zheng J.J., Xu L., Holmes E.C., Zhang Y.Z. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China // *Nature*. 2020. V. 579 (7798). P. 265-269. doi: 10.1038/s41586-020-2008-3.
199. Wu F.Q., Xiao A., Zhang J.B., Gu X.Q., Lee W.L., Kauffman K., Hanage W.P., Matus M., Ghaeli N., Endo N., Duvallat C., Moniz K., Erickson T.B., Chai P.R., Thompson J., Alm E.J. SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases // *medRxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.05.20051540>.
200. Wu Q., Xu Z., Wei T., Zeng H., Li J., Gang H., Sun M., Jiang F., Wang X., Dong W., Yang L., Wang J. Development of Taqman RT-nested PCR system for clinical SARS-CoV detection // *Journal of Virology Methods*. 2004. V. 119 (1). P. 17-23. doi: 10.1016/j.jviromet.2004.02.011
201. Wu X., Cheng G., Di B., Yin A., He Y., Wang M., Zhou X., He L., Luo K., Du L. Establishment of a fluorescent polymerase chain reaction method for the detection of the SARS-associated coronavirus and its clinical application // *Chinese Medical Journal*. 2003. V. 116 (7). P. 988-990.
202. Xie C., Jiang L., Huang G., Pu H., Gong B., Lin H., Ma S., Chen X., Long B., Si G., Yu H., Jiang L., Yang X., Shi Y., Yang Z. Comparison of different samples for 2019 novel coronavirus detection by nucleic acid amplification tests // *International Journal of Infectious Diseases*. 2020. V. 93. P. 264-267. doi: 10.1016/j.ijid.2020.02.050.
203. Xie Q., Cao Y., Su J., Wu X., Wan C., Ke C., Zhao W., Zhang B. Genomic sequencing and analysis of the first imported Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS CoV) in China // *Science China Life Sciences*. 2015. V. 58 (8). P. 818-20. doi: 10.1007/s11427-015-4903-7.
204. Xie X., Zhong Z., Zhao W., Zheng C., Wang F., Liu J. Chest CT for Typical 2019-nCoV Pneumonia: Relationship to Negative RT-PCR Testing // *Radiology*. 2020. 200343. doi: 10.1148/radiol.2020200343.
205. Yam W.C., Chan K.H., Poon L.L., Guan Y., Yuen K.Y., Seto W.H., Peiris J.S. Evaluation of reverse transcription-PCR assays for rapid diagnosis of severe acute respiratory syndrome associated with a novel coronavirus // *Journal of Clinical Microbiology*. 2003. V. 41 (10). P. 4521-4. doi: 10.1128/jcm.41.10.4521-4524.2003.
206. Yang D., Leibowitz J.L. The structure and functions of coronavirus genomic 3' and 5' ends // *Virus Research*. 2015. V. 206. P. 120-33. doi: 10.1016/j.virusres.2015.02.025.
207. Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2 // *Science*. 2020. V.367(6485). P.1444-1448. DOI: 10.1126/science.abb2762.
208. Yang Z.Y., Kong W.P., Huang Y., Roberts A., Murphy B.R., Subbarao K., Nabel G.J. A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice // *Nature*. 2004. V. 428 (6982). P. 561-4. doi: 10.1038/nature02463.
209. Yaren O., Glushakova L.G., Bradley K.M., Hoshika S., Benner S.A. Standard and AEGIS nicking molecular beacons detect amplicons from the Middle East respiratory syndrome coronavirus // *Journal of Virology Methods*. 2016. V. 236. P. 54-61. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.07.008.
210. Ye Z.W., Yuan S., Yuen K.S., Fung S.Y., Chan C.P., Jin D.Y. Zoonotic origins of human coronaviruses //

- International Journal of Biological Sciences*. 2020. V. 16 (10). P. 1686-1697. doi: 10.7150/ijbs.45472.
211. Yip C.C., Ho C.C., Chan J.F., To K.K., Chan H.S., Wong S.C., Leung K.H., Fung A.Y., Ng A.C., Zou Z., Tam A.R., Chung T.W., Chan K.H., Hung I.F., Cheng V.C., Tsang O.T., Tsui S.K.W., Yuen K.Y. Development of a Novel, Genome Subtraction-Derived, SARS-CoV-2-Specific COVID-19-nsp2 Real-Time RT-PCR Assay and Its Evaluation Using Clinical Specimens // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. V. 21 (7). pii: E2574. doi: 10.3390/ijms21072574.
212. Yoon I.K., Kim J.H. First clinical trial of a MERS coronavirus DNA vaccine // *The Lancet Infectious Diseases*. 2019. V. 19 (9). P. 924-925. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30397-4.
213. Yount B., Curtis K.M., Fritz E.A., Hensley L.E., Jahrling P.B., Prentice E., Denison M.R., Geisbert T.W., Baric R.S. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100 (22). P. 12995-3000. doi: 10.1073/pnas.1735582100
214. Yu F., Yan L., Wang N., Yang S., Wang L., Tang Y., Gao G., Wang S., Ma C., Xie R., Wang F., Tan C., Zhu L., Guo Y., Zhang F. Quantitative Detection and Viral Load Analysis of SARS-CoV-2 in Infected Patients // *Clinical Infectious Diseases*. 2020. pii: ciaa345. doi: 10.1093/cid/ciaa345.
215. Zakhartchouk A.N., Viswanathan S., Moshynskyy I., Petric M., Babiuk L.A. Optimization of a DNA vaccine against SARS // *DNA and Cell Biology*. 2007. V. 26 (10). P. 721-6. doi: 10.1089/dna.2007.0616.
216. Zaki A.M., van Boheemen S., Bestebroer T.M., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia // *New England Journal of Medicine*. 2012. V. 367 (19). P. 1814-20. doi: 10.1056/NEJMoa1211721.
217. Zeng F., Chow K.Y., Hon C.C., Law K.M., Yip C.W., Chan K.H., Peiris J.S., Leung F.C. Characterization of humoral responses in mice immunized with plasmid DNAs encoding SARS-CoV spike gene fragments // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004. V. 315 (4). P. 1134-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.01.166.
218. Zhang J., Meng B., Liao D., Zhou L., Zhang X., Chen L., Guo Z., Peng C., Zhu B., Lee P.P., Xu X., Zhou T., Deng Z., Hu Y., Li K. De novo synthesis of PCR templates for the development of SARS diagnostic assay // *Molecular Biotechnology*. 2003. V. 25 (2). P. 107-12. doi: 10.1385/MB:25:2:107.
219. Zhang T., Wu Q., Zhang Z. Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak // *Current Biology*. 2020. V. 30 (7). P. 1346-1351.e2. doi: 10.1016/j.cub.2020.03.022.
220. Zhang Y., Qu S., Xu L. Progress in the study of virus detection methods: The possibility of alternative methods to validate virus inactivation // *Biotechnology and Bioengineering*. 2019. V. 116 (8). P. 2095-2102. doi: 10.1002/bit.27003.
221. Zhang Y., Odiwuor N., Xiong J., Sun L., Nyaruaba R.O., Wei H., Tanner N.A. Rapid Molecular Detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) Virus RNA Using Colorimetric LAMP // medRxiv. 2020a. doi: 10.1101/2020.02.26.20028373.
222. Zhao P., Ke J.S., Qin Z.L., Ren H., Zhao L.J., Yu J.G., Gao J., Zhu S.Y., Qi Z.T. DNA vaccine of SARS-Cov S gene induces antibody response in mice // *Acta Biochimica Biophysica Sinica (Shanghai)*. 2004 Jan;36(1):37-41. doi: 10.1093/abbs/36.1.37.
223. Zhao Z, Li H, Wu X, Zhong Y, Zhang K, Zhang YP, Boerwinkle E, Fu YX. Moderate mutation rate in the SARS coronavirus genome and its implications // *BMC Evol Biol*. 2004. V.4. 21. DOI: 10.1186/1471-2148-4-21.
224. Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Zhao X., Huang B., Shi W., Lu R., Niu P., Zhan F., Ma X., Wang D., Xu W., Wu G., Gao G.F., Tan W. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019 // *New England Journal of Medicine*. 2020. V. 382 (8). P. 727-733. doi: 10.1056/NEJMoa2001017.
225. Zlateva K.T., Coenjaerts F.E., Crusio K.M., Lammens C., Leus F., Viveen M., Ieven M., Spaan W.J., Claas E.C., Gorbalenya A.E. No novel coronaviruses identified in a large collection of human nasopharyngeal specimens using family-wide CODEHOP-based primers // *Archives of Virology*. 2013. V. 158 (1). P. 251-5. doi: 10.1007/s00705-012-1487-4.
226. Zlateva K.T., Crusio K.M., Leontovich A.M., Lauber C., Claas E., Kravchenko A.A., Spaan W.J., Gorbalenya A.E. Design and validation of consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for broad and sensitive detection of corona- and toroviruses // *Journal of Virology Methods*. 2011. V. 177 (2). P. 174-83. doi: 10.1016/j.jviromet.2011.08.005.

References

1. Abd El Wahed A., Patel P., Heidenreich D., Hufert F.T., Weidmann M. Reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for the detection of middle East respiratory syndrome coronavirus. *PLoS Currents*. 2013. V.5. pii: ecurrents.outbreaks.62df1c7c75ffc96cd59034531e2e8364. doi: 10.1371/currents.outbreaks.62df1c7c75ffc96cd59034531e2e8364.
2. Ai T., Yang Z., Hou H., Zhan C., Chen C., Lv W., Tao Q., Sun Z., Xia L. Correlation of Chest CT and RT-PCR Testing in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in China: A Report of 1014 Cases.

- Radiology*. 2020. 200642. doi: 10.1148/radiol.2020200642.
3. Al-Abdallat M.M., Payne D.C., Alqasrawi S., Rha B., Tohme R.A., Abedi G.R., Al Nsour M., Iblan I., Jarour N., Farag N.H., Haddadin A., Al-Sanouri T., Tamin A., Harcourt J.L., Kuhar D.T., Swerdlow D.L., Erdman D.D., Pallansch M.A., Haynes L.M., Gerber S.I. Hospital-associated outbreak of Middle East respiratory syndrome coronavirus: a serologic, epidemiologic, and clinical description. *Clinical Infectious Diseases*. 2014. V. 59 (9). P. 1225-33. doi: 10.1093/cid/ciu359.
 4. Alagaili A.N., Briese T., Mishra N., Kapoor V., Sameroff S.C., Burbelo P.D., de Wit E., Munster V.J., Hensley L.E., Zalmout I.S., Kapoor A., Epstein J.H., Karesh W.B., Daszak P., Mohammed O.B., Lipkin W.I. Middle East respiratory syndrome coronavirus infection in dromedary camels in Saudi Arabia. *mBio*. 2014. V. 5 (2). e00884-14. doi: 10.1128/mBio.00884-14.
 5. Al-Amri S.S., Abbas A.T., Siddiq L.A., Alghamdi A., Sanki M.A., Al-Muhanna M.K., Alhabbab R.Y., Azhar E.I., Li X., Hashem A.M. Immunogenicity of Candidate MERS-CoV DNA Vaccines Based on the Spike Protein. *Scientific Reports*. 2017. V. 7. 44875. doi: 10.1038/srep44875.
 6. Andersen K.G., Rambaut A., Lipkin W.I., Holmes E.C., Garry R.F. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine*. 2020. V. 26. P. 450–452. doi: 10.1038/s41591-020-0820-9.
 7. Arabi Y.M., Balkhy H.H., Hayden F.G., Bouchama A., Luke T., Baillie J.K., Al-Omari A., Hajeer A.H., Senga M., Denison M.R., Nguyen-Van-Tam J.S., Shindo N., Birmingham A., Chappell J.D., Van Kerkhove M.D., Fowler R.A. Middle East Respiratory Syndrome. *New England Journal of Medicine*. 2017. V. 376 (6). P. 584-594. doi: 10.1056/NEJMs1408795.
 8. Azhar E.I., El-Kafrawy S.A., Farraj S.A., Hassan A.M., Al-Saeed M.S., Hashem A.M., Madani T.A.. Evidence for camel-to-human transmission of MERS coronavirus. *New England Journal of Medicine*. 2014. V. 370 (26). P. 2499-505. doi: 10.1056/NEJMoa1401505.
 9. Baek YH, Um J, Antigua KJC, Park JH, Kim Y, Oh S, Kim YI, Choi WS, Kim SG, Jeong JH, Chin BS, Nicolas HDG, Ahn JY, Shin KS, Choi YK, Park JS, Song MS. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification as a rapid early-detection method for novel SARS-CoV-2. *Emerg Microbes Infect*. 2020. doi: 10.1080/22221751.2020.1756698.
 10. Baymiev An.Kh., Baymiev Al.Kh., Kuluev B.R., Shvets K.Yu., Yamidanov R.S., Matniyazov R.T., Chemeris D.A., Zubov V.V., Alekseev Ya.I., Mavzyutov A.R., Ivanenkov Ya.A. Chemeris A.V. Modern approaches to differentiation of live and dead bacteria using selective amplification of nucleic acids. *Microbiology*. 2020. V. 89(1). P. 13–27. DOI: 10.1134/S0026261720010038.
 11. Becker M.M., Graham R.L., Donaldson E.F., Rockx B., Sims A.C., Sheahan T., Pickles R.J., Corti D., Johnston R.E., Baric R.S., Denison M.R. Synthetic recombinant bat SARS-like coronavirus is infectious in cultured cells and in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105 (50). P. 19944-9. doi: 10.1073/pnas.0808116105.
 12. Benvenuto D., Giovanetti M., Ciccozzi A., Spoto S., Angeletti S., Ciccozzi M. The 2019-new coronavirus epidemic: Evidence for virus evolution. *Journal of Medical Virology*. 2020. V. 92 (4). P. 455-459. doi: 10.1002/jmv.25688.
 13. Bin S.Y., Heo J.Y., Song M.-S., Lee J., Kim E.-H., Park S.-J., Kwon H.-I., Kim S.-M., Kim Y.-I., Si Y.-J., Lee I.-W., Baek Y.H., Choi W.-S., Min J., Jeong H.W., Choi Y.K. Environmental Contamination and Viral Shedding in MERS Patients During MERS-CoV Outbreak in South Korea. *Clinical Infectious Diseases*. 2016. V. 62 (6). P. 755-60. doi: 10.1093/cid/civ1020.
 14. Booth T.F., Kournikakis B., Bastien N., Ho J., Kobasa D., Stadnyk L., Li Y., Spence M., Paton S., Henry B., Mederski B., White D., Low D.E., McGeer A., Simor A., Vearncombe M., Downey J., Jamieson F.B., Tang P., Plummer F. Detection of airborne severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus and environmental contamination in SARS outbreak units. *Journal of Infectious Diseases*. 2005. V. 191 (9). P. 1472-7. doi: 10.1086/429634.
 15. Broughton J.P., Deng X., Yu G., Fasching C.L., Servellita V., Singh J., Miao X., Streithorst J.A., Granados A., Sotomayor-Gonzalez A., Zorn K., Gopez A., Hsu E., Gu W., Miller S., Pan C.-Y., Guevara H., Wadford D.A., Chen J.C., Chiu C.Y. CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nature Biotechnology*. 2020. doi: 10.1038/s41587-020-0513-4.
 16. Cagliani R., Forni D., Clerici M., Sironi M. Computational inference of selection underlying the evolution of the novel coronavirus, SARS-CoV-2. *Journal of Virology*. 2020. pii: JVI.00411-20. doi: 10.1128/JVI.00411-20.
 17. Ceraolo C., Giorgi F.M. Genomic variance of the 2019-nCoV coronavirus. *Journal of Medical Virology*. 2020. V. 92 (5). P. 522-528. doi: 10.1002/jmv.25700.
 18. Chan J.F., Choi G.K., Tsang A.K., Tee K.M., Lam H.Y., Yip C.C., To K.K., Cheng V.C., Yeung M.L., Lau S.K., Woo P.C., Chan K.H., Tang B.S., Yuen K.Y. Development and Evaluation of Novel Real-Time Reverse Transcription-PCR Assays with Locked Nucleic Acid Probes Targeting Leader Sequences of Human-Pathogenic Coronaviruses. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015. V. 53 (8). P. 2722-6. doi: 10.1128/JCM.01224-15.

19. Chan J.F., Yip C.C., To K.K., Tang T.H., Wong S.C., Leung K.H., Fung A.Y., Ng A.C., Zou Z., Tsoi H.W., Choi G.K., Tam A.R., Cheng V.C., Chan K.H., Tsang O.T., Yuen K.Y. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/He1 real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay validated in vitro and with clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2020. V. pii: JCM.00310-20. doi: 10.1128/JCM.00310-20.
20. Chantratita W., Pongtanapisit W., Piroj W., Srichunrasmi C., Seesuai S. Development and comparison of the real-time amplification based methods--NASBA-Beacon, RT-PCR taqman and RT-PCR hybridization probe assays--for the qualitative detection of sars coronavirus. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 2004. V. 35 (3). P. 623-9.
21. Chemeris A.V. CRISPR/Cas Systems (Special thematic issue). *Biomics*. 2017. V. 9 (3). P. 148-154. (In Russian).
22. Chemeris A.V., Bikbulatova S.M., Chemeris D.A., Baymiev A.K., Knyazev A.V., Kuluev B.R., Maksimov I.V. Should beware of the GMOs? On-site observers view on the hysteria around. *Biomics*. 2014. V. 6 (2). P. 77-138. (In Russian).
23. Chemeris A.V., Chemeris D.A., Baymiev A.K., Knyazev A.V., Kuluev B.R., Maksimov I.V. The fight against GMO is neolysenkoism. *Biomics*. 2015. V. 7 (1). P. 1-39. (In Russian).
24. Chemeris A.V., Chemeris D.A., Magdanov E.G., Garafutdinov R.R., Nagaev N.R., Vakhitov V.A. Causes of false-negative PCR and how to avoid some of them. *Biomics*. 2012. V. 4. P. 31-47. (In Russian).
25. Chemeris A.V., Magdanov E.G., Garafutdinov R.R., Vakhitov V.A. How to avoid the appearance of false-positive results in a polymerase chain reaction? *Yu.A. Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology*. 2012. V. 8 (3). P. 34-45. (In Russian).
26. Chemeris D.A., Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Maleev G.V., Chemeris A.V. Convection PCR in different types of convective cells. *Biomics*. 2018. V. 10 (4). P. 410-443. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-52 (In Russian).
27. Chemeris D.A., Magdanov E.G., Mashkov O.I., Garafutdinov R.R., Chemeris A.V. Hot start or time-release PCR. *Biomics*. 2011. V. 2 (1). P. 1-8. (In Russian).
28. Chen L., Liu W., Zhang Q., Xu K., Ye G., Wu W., Sun Z., Liu F., Wu K., Zhong B., Mei Y., Zhang W., Chen Y., Li Y., Shi M., Lan K., Liu Y. RNA based mNGS approach identifies a novel human coronavirus from two individual pneumonia cases in 2019 Wuhan outbreak. *Emerging Microbes and Infections*. 2020. V. 9 (1). P. 313-319. doi: 10.1080/22221751.2020.1725399.
29. Chen W., Li S., Shao B., Zheng T., Jiang S., Huang X., Cai K., Zhang Z. Preliminary study on the detection of the SARS-CoV specific target cDNA fragments by multiplex PCR. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2004. V. 2 (1). P. 55-8. doi: 10.1016/s1672-0229(04)02008-x.
30. Chen W., Xu Z., Mu J., He B., Yang L., Lin L., Meng S., Mu F., Gan H., Huang S., Wen J., Fang J., Wang J. Real-time quantitative fluorescent reverse transcriptase-PCR for detection of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus RNA. *Molecular Diagnostics*. 2004. V. 8 (4). P. :231-5. doi: 10.1007/bf03260067.
31. Chen W.H., Strych U., Hotez P.J., Bottazzi M.E. The SARS-CoV-2 Vaccine Pipeline: an Overview. *Current Tropical Medicine Reports*. 2020. P. 1-4. doi: 10.1007/s40475-020-00201-6.
32. Chi H., Zheng X., Wang X., Wang C., Wang H., Gai W., Perlman S., Yang S., Zhao J., Xia X. DNA vaccine encoding Middle East respiratory syndrome coronavirus S1 protein induces protective immune responses in mice. *Vaccine*. 2017. V. 35 (16). P. 2069-2075. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.02.063.
33. Chin A.W.H., Chu J.T.S., Perera M.R.A., Hui K.P.Y., Yen H.-L., Chan M.C.W., Peiris M., Poon L.L.M. Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. *medRxiv*. 2020. doi: 10.1016/S2666-5247(20)30003-3.
34. Chu D.K.W., Pan Y., Cheng S.M.S., Hui K.P.Y., Krishnan P., Liu Y., Ng D.Y.M., Wan C.K.C., Yang P., Wang Q., Peiris M., Poon L.L.M. Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clinical Chemistry*. 2020. V. 66 (4). P. 549-555. doi: 10.1093/clinchem/hvaa029.
35. Chubukova O.V., Khasanova S.S., Nikonorov Yu.M., Kulagin V.F., Chemeris A.V., Vakhitov V.A. Immunogenicity of Puumal hantavirus N-protein for outbred mice with intramuscular injection of its gene. *Issues of Virology*. 2008. V. 53 (4). P. 38-41.
36. Chubukova O.V., Nikonorov Yu.M. Prospects for the use of DNA vaccines in the prevention of hantavirus infections. *Pacific Medical Journal*. 2008. No. 2. P. 37-40.
37. Chui L., Drebot M., Andonov A., Petrich A., Glushek M., Mahony J. Comparison of 9 different PCR primers for the rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus using 2 RNA extraction methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2005. V. 53 (1). P. 47-55. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2005.03.007.
38. Chunling M., Kun Y., Jian X., Jian Q., Hua S., Minsheng Z. Enhanced induction of SARS-CoV nucleocapsid protein-specific immune response using

- DNA vaccination followed by adenovirus boosting in BALB/c mice. *Intervirology*. 2006. V. 49 (5). P. 307-18. doi: 10.1159/000094247.
39. Cockrell A.S., Beall A., Yount B., Baric R. Efficient Reverse Genetic Systems for Rapid Genetic Manipulation of Emergent and Preemergent Infectious Coronaviruses. *Methods in Molecular Biology*. 2017. V. 1602. P. 59-81. doi: 10.1007/978-1-4939-6964-7_5.
40. Cohen J. New coronavirus threat galvanizes scientists. *Science*. 2020. V.367(6477). P.492-493. doi: 10.1126/science.367.6477.492.
41. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*. 1991. V. 350. P. 91-92. doi: 10.1038/350091a0.
42. Corman V.M., Eckerle I., Bleicker T., Zaki A., Landt O., Eschbach-Bludau M., van Boheemen S., Gopal R., Ballhause M., Bestebroer T.M., Muth D., Müller M.A., Drexler J.F., Zambon M., Osterhaus A.D., Fouchier R.M., Drosten C. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Euro Surveillance*. 2012. V. 17 (39). pii: 20285. doi: 10.2807/ese.17.39.20285-en.
43. Corman V.M., Kallies R., Philipps H., Göpner G., Müller M.A., Eckerle I., Brünink S., Drosten C., Drexler J.F. Characterization of a novel betacoronavirus related to middle East respiratory syndrome coronavirus in European hedgehogs. *Journal of Virology*. 2014. V. 88 (1). P. 717-24. doi: 10.1128/JVI.01600-13.
44. Corman V.M., Landt O., Kaiser M., Molenkamp R., Meijer A., Chu D.K.W., Bleicker T., Brünink S., Schneider J., Schmidt M.L., Mulders D.G.J.C., Haagmans B.L., van der Veer B., van den Brink S., Wijsman L., Goderski G., Romette J.L., Ellis J., Zambon M., Peiris M., Goossens H., Reusken C., Koopmans M.P.G., Drosten C. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveillance*. 2020. V. 25 (3). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
45. Corman V.M., Müller M.A., Costabel U., Timm J., Binger T., Meyer B., Kreher P., Lattwein E., Eschbach-Bludau M., Nitsche A., Bleicker T., Landt O., Schweiger B., Drexler J.F., Osterhaus A.D., Haagmans B.L., Dittmer U., Bonin F., Wolff T., Drosten C. Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections. *Euro Surveillance*. 2012a. V. 17 (49). pii: 20334. doi: 10.2807/ese.17.49.20334-en.
46. Corman V.M., Ölschläger S., Wendtner C.M., Drexler J.F., Hess M., Drosten C. Performance and clinical validation of the RealStar MERS-CoV Kit for detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus RNA. *Journal of Clinical Virology*. 2014a. V.60 (2). P. 168-71. doi: 10.1016/j.jcv.2014.03.012.
47. Cotten M., Lam T.T., Watson S.J., Palser A.L., Petrova V., Grant P., Pybus O.G., Rambaut A., Guan Y., Pillay D., Kellam P., Nastouli E. Full-genome deep sequencing and phylogenetic analysis of novel human betacoronavirus. *Emerging Infectious Diseases*. 2013. V. 19 (5). P. 736-42B. doi: 10.3201/eid1905.130057.
48. Curi L., Federico P.-B., Gimenez C.A. An ultrasensitive, rapid, and portable coronavirus SARS-CoV-2 sequence detection method based on CRISPR-Cas12. *bioRxiv preprint*. doi: 10.1101/2020.02.29.971127.
49. de Groot R.J., Baker S.C., Baric R.S., Brown C.S., Drosten C., Enjuanes L., Fouchier R.A., Galiano M., Gorbalenya A.E., Memish Z.A., Perlman S., Poon L.L., Snijder E.J., Stephens G.M., Woo P.C., Zaki A.M., Zambon M., Ziebuhr J. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *Journal of Virology*. 2013. V. 87 (14). P. 7790-2. doi: 10.1128/JVI.01244-13.
50. Debabov V.G. DNA vaccination and gene therapy based on transient expression of nucleic acids in human and animal somatic cells. *Molecular Biology. (Mosk)*. 1997. V. 31 (2). P. 209-215 (in Russian).
51. Ding X., Yin K., Li Z., Liu C. All-in-One Dual CRISPR-Cas12a (AIOD-CRISPR) Assay: A Case for Rapid, Ultrasensitive and Visual Detection of Novel Coronavirus SARS-CoV-2 and HIV virus. *bioRxiv*. 2020. doi: 10.1101/2020.03.19.998724.
52. Douglas C.E., Kulesh D.A., Jaissle J.G., Minogue T.D. Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction assays for Middle East Respiratory Syndrome. *Molecular and Cellular Probes*. 2015. V. 29 (6). P. 511-513. doi: 10.1016/j.mcp.2015.09.001.
53. Dowell S.F., Simmerman J.M., Erdman D.D., Wu J.S., Chaovavanich A., Javadi M., Yang J.Y., Anderson L.J., Tong S., Ho M.S. Severe acute respiratory syndrome coronavirus on hospital surfaces. *Clinical Infectious Diseases*. 2004. V. 39 (5). P. 652-7. doi: 10.1086/422652.
54. Drexler J.F., Gloza-Rausch F., Glende J., Corman V.M., Muth D., Goettsche M., Seebens A., Niedrig M., Pfefferle S., Yordanov S., Zhelyazkov L., Hermanns U., Vallo P., Lukashev A., Müller M.A., Deng H., Herrler G., Drosten C. Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences. *Journal of Virology*. 2010. V. 84 (21). P. 11336-49. doi: 10.1128/JVI.00650-10.
55. Drosten C., Günther S., Preiser W., van der Werf S., Brodt H.R., Becker S., Rabenau H., Panning M., Kolesnikova L., Fouchier R.A., Berger A., Burguière A.M., Cinatl J., Eickmann M., Escriou N., Grywna K., Kramme S., Manuguerra J.C., Müller S., Rickerts V.,

- Stürmer M., Vieth S., Klenk H.D., Osterhaus A.D., Schmitz H., Doerr H.W. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *New England Journal of Medicine*. 2003. V. 348 (20). P. 1967-76. doi: 10.1056/NEJMoa030747.
56. Duan S.M., Zhao X.S., Wen R.F., Huang J.J., Pi G.H., Zhang S.X., Han J., Bi S.L., Ruan L., Dong X.P. Stability of SARS coronavirus in human specimens and environment and its sensitivity to heating and UV irradiation. *Biomedical and Environmental Sciences*. 2003. V. 16 (3). P. 246-55.
57. El-Tholoth M, Bau HH, Song J. A Single and Two-Stage, Closed-Tube, Molecular Test for the 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) at Home, Clinic, and Points of Entry. *ChemRxiv*. 2020. DOI: 10.26434/chemrxiv.11860137.v
58. Escutenaire S., Mohamed N., Isaksson M., Thorén P., Klingeborn B., Belák S., Berg M., Blomberg J. SYBR Green real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the generic detection of coronaviruses. *Archives of Virology*. 2007. V. 152 (1). P. 41-58. doi: 10.1007/s00705-006-0840-x.
59. Fang Y., Zhang H., Xie J., Lin M., Ying L., Pang P., Ji W. Sensitivity of Chest CT for COVID-19: Comparison to RT-PCR. *Radiology*. 2020. 200432. doi: 10.1148/radiol.2020200432.
60. Fongaro G., Hernández M., García-González M.C., Barardi C.R., Rodríguez-Lázaro D. Propidium Monoazide Coupled with PCR Predicts Infectivity of Enteric Viruses in Swine Manure and Biofertilized Soil. *Food and Environmental Virology*. 2016. V. 8 (1). P. 79-85. doi: 10.1007/s12560-015-9225-1.
61. Forster P., Forster L., Renfrew C., Forster M. Phylogenetic network analysis of SARS-CoV-2 genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020. pii: 202004999. doi: 10.1073/pnas.2004999117.
62. Gao Y., Yan L., Huang Y., Liu F., Zhao Y., Cao L., Wang T., Sun Q., Ming Z., Zhang L., Ge J., Zheng L., Zhang Y., Wang H., Zhu Y., Zhu C., Hu T., Hua T., Zhang B., Yang X., Li J., Yang H., Liu Z., Xu W., Guddat L.W., Wang Q., Lou Z., Rao Z. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus. *Science*. 2020. pii: eabb7498. doi: 10.1126/science.abb7498.
63. Garafutdinov R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R., Vakhitov V.A., Chemeris A.V. DNA Amplification Using PCR with Abutting Primers. *Molecular Biology*. 2015. V. 49 (4). P. 628-37. doi: 10.1134/S0026893315040056.
64. Garafutdinov R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R. Polymerase chain reaction with nearby primers. *Analytical Biochemistry*. 2017. V. 518. P. 126-133. doi: 10.1016/j.ab.2016.11.017.
65. Ge X.Y., Li J.L., Yang X.L., Chmura A.A., Zhu G., Epstein J.H., Mazet J.K., Hu B., Zhang W., Peng C., Zhang Y.J., Luo C.M., Tan B., Wang N., Zhu Y., Crameri G., Zhang S.Y., Wang L.F., Daszak P., Shi Z.L. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature*. 2013. V. 503 (7477). P. 535-8. doi: 10.1038/nature12711.
66. Glushakova L.G., Sharma N., Hoshika S., Bradley A.C., Bradley K.M., Yang Z., Benner S.A. Detecting respiratory viral RNA using expanded genetic alphabets and self-avoiding DNA. *Analytical Biochemistry*. 2015. V. 489. P. 62-72. doi: 10.1016/j.ab.2015.08.015.
67. Go Y.Y., Kim Y.S., Cheon S., Nam S., Ku K.B., Kim M., Cho N.H., Park H., Lee P., Lin Y.C., Tsai Y.L., Wang H.T., Balasuriya U.B.R. Evaluation and Clinical Validation of Two Field-Deployable Reverse Transcription-Insulated Isothermal PCR Assays for the Detection of the Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2017. V. 19 (6). P. 817-827. doi: 10.1016/j.jmoldx.2017.06.007.
68. Gorbalenya A.E., Baker S.C., Baric R.S., de Groot R.J., Drosten C., Gulyaeva A.A., Haagmans B.L., Lauber C., Leontovich A.M., Neuman B.W., Penzar D., Perlman S., Poon L.L.M., Samborskiy D.V., Sidorov I.A., Sola I., Ziebuhr J. - Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*. 2020. V. 5 (4). P. 536-544. doi: 10.1038/s41564-020-0695-z.
69. Guatelli J.C., Whitfield K.M., Kwok D.Y., Barringer K.J., Richman D.D., Gingeras T.R. Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990. V. 87. P. 1874-1878. doi: 10.1073/pnas.87.5.1874.
70. Gundy P.M., Gerba C.P., Pepper I.L. Survival of Coronaviruses in Water and Wastewater. *Food and Environmental Virology*. 2009. V. 1 (1). P. 10. doi: 10.1007/s12560-008-9001-6.
71. Hao W., Li M. Clinical diagnostic value of CT imaging in COVID-19 with multiple negative RT-PCR testing. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 2020. 101627. doi: 10.1016/j.tmaid.2020.101627.
72. Hashemzadeh M.S., Rasouli R., Zahraei B., Izadi M., Tat M., Saadat S.H., Najarasl M., Khansari N.B., Dorostkar R. Development of Dual TaqMan Based One-Step rRT-PCR Assay Panel for Rapid and Accurate Diagnostic Test of MERS-CoV: A Novel Human Coronavirus, Ahead of Hajj Pilgrimage. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 2016. V. 18 (11). e23874. doi: 10.5812/ircmj.23874.
73. Hecht L.S., Jurado-Jimenez A., Hess M., Halas H.E., Bochenek G., Mohammed H., Alzahrani F., Asiri M.O., Hasan R., Alamri A., Alotaibi S. Verification and diagnostic evaluation of the RealStar® Middle East

- respiratory syndrome coronavirus (N gene) reverse transcription-PCR kit 1.0. *Future Microbiology*. 2019. V. 14. P. 941-948. doi: 10.2217/fmb-2019-0067.
74. Holland J, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S, VandePol S. Rapid evolution of RNA genomes. *Science*. 1982. V.215(4540). P.1577-1585. DOI: 10.1126/science.7041255.
75. Hong TC, Mai QL, Cuong DV, Parida M, Minekawa H, Notomi T, Hasebe F, Morita K. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Clin Microbiol*. 2004. V.42(5). P.1956-1961. DOI: 10.1128/jcm.42.5.1956-1961.2004
76. Hoteit R., Shammaa D., Mahfouz R. Use of the Human Coronavirus 2012 (MERS) GeneSig kit for MERS-CoV detection. *Gene Reports*. 2016. V. 4. P. 67-69. doi: 10.1016/j.genrep.2016.04.004.
77. Hou T., Zeng W., Yang M., Chen W., Ren L., Ai J., Wu J., Liao Y., Gou X., Li Y., Wang X., Su H., Gu B., Wang J., Xu T. Development and Evaluation of A CRISPR-based Diagnostic For 2019-novel Coronavirus. *medRxiv*. 2020. doi: 10.1101/2020.02.22.20025460.
78. Hu B., Zeng L.P., Yang X.L., Ge X.Y., Zhang W., Li B., Xie J.Z., Shen X.R., Zhang Y.Z., Wang N., Luo D.S., Zheng X.S., Wang M.N., Daszak P., Wang L.F., Cui J., Shi Z.L. Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus. *PLoS Pathogens*. 2017. V. 13 (11). e1006698. doi: 10.1371/journal.ppat.1006698.
79. Hu H., Jung K., Wang Q., Saif L.J., Vlasova A.N. Development of a one-step RT-PCR assay for detection of pancoronaviruses (α -, β -, γ -, and δ -coronaviruses) using newly designed degenerate primers for porcine and avian fecal samples. *Journal of Virology Methods*. 2018. V. 256. P. 116-122. doi: 10.1016/j.jviromet.2018.02.021.
80. Hu W., Bai B., Hu Z., Chen Z., An X., Tang L., Yang J., Wang H., Wang H. Development and evaluation of a multitarget real-time Taqman reverse transcription-PCR assay for detection of the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus and surveillance for an apparently related coronavirus found in masked palm civets. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005. V. 43 (5). P. 2041-6. doi: 10.1128/JCM.43.5.2041-2046.2005.
81. Huang J.L., Lin H.T., Wang Y.M., Yeh Y.C., Peck K., Lin B.L., Liu H.W., Chen A., Lin C.S. Rapid and sensitive detection of multiple genes from the SARS-coronavirus using quantitative RT-PCR with dual systems. *Journal of Medical Virology*. 2005. V. 77 (2). P. 151-8. doi: 10.1002/jmv.20432.
82. Huang P., Wang H., Cao Z., Jin H., Chi H., Zhao J., Yu B., Yan F., Hu X., Wu F., Jiao C., Hou P., Xu S., Zhao Y., Feng N., Wang J., Sun W., Wang T., Gao Y., Yang S., Xia X. A Rapid and Specific Assay for the Detection of MERS-CoV. *Frontiers in Microbiology*. 2018. V. 9. 1101. doi: 10.3389/fmicb.2018.01101.
83. Huh H.J., Kim J.Y., Kwon H.J., Yun S.A., Lee M.K., Ki C.S., Lee N.Y., Kim J.W. Performance Evaluation of the PowerChek MERS (upE & ORF1a) Real-Time PCR Kit for the Detection of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus RNA. *Annals of Laboratory Medicine*. 2017. V. 37 (6). P. 494-498. doi: 10.3343/alm.2017.37.6.494.
84. Hulswit R.J., de Haan C.A., Bosch B.J. Coronavirus Spike Protein and Tropism Changes. *Advances in Virus Reserach*. 2016. V. 96. P. 29-57. doi: 10.1016/bs.aivir.2016.08.004.
85. Ji W., Wang W., Zhao X., Zai J., Li X. Cross-species transmission of the newly identified coronavirus 2019-nCoV. *Journal of Medical Virology*. 2020. V. 92 (4). P. 433-440. doi: 10.1002/jmv.25682.
86. Juang J.L., Chen T.C., Jiang S.S., Hsiung C.A., Chen W.C., Chen G.W., Lin S.M., Lin J.H., Chiu S.C., Lai Y.K. Coupling multiplex RT-PCR to a gene chip assay for sensitive and semiquantitative detection of severe acute respiratory syndrome-coronavirus. *Laboratory Investigation*. 2004. V. 84 (9). P. 1085-91. doi: 10.1038/labinvest.3700136.
87. Kampf G., Todt D., Pfaender S., Steinmann E. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *Journal of Hospital Infection*. 2020. V. 104 (3). P. 246-251. doi: 10.1016/j.jhin.2020.01.022.
88. Kan B., Wang M., Jing H., Xu H., Jiang X., Yan M., Liang W., Zheng H., Wan K., Liu Q., Cui B., Xu Y., Zhang E., Wang H., Ye J., Li G., Li M., Cui Z., Qi X., Chen K., Du L., Gao K., Zhao Y.T., Zou X.Z., Feng Y.J., Gao Y.F., Hai R., Yu D., Guan Y., Xu J. Molecular evolution analysis and geographic investigation of severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in palm civets at an animal market and on farms. *Journal of Virology*. 2005. V. 79 (18). P. 11892-900. doi: 10.1128/JVI.79.18.11892-11900.2005.
89. Keightley M.C., Sillekens P., Schippers W., Rinaldo C., George K.S. Real-time NASBA detection of SARS-associated coronavirus and comparison with real-time reverse transcription-PCR. *Journal of Medical Virology*. 2005. V. 77 (4). P. 602-8. doi: 10.1002/jmv.20498.
90. Kim J.M., Chung Y.S., Jo H.J., Lee N.J., Kim M.S., Woo S.H., Park S., Kim J.W., Kim H.M., Han M.G. Identification of Coronavirus Isolated from a Patient in Korea with COVID-19. *Osong Public Health and*

- Research Perspectives*. 2020. V. 11 (1). P. 3-7. doi: 10.24171/j.phrp.2020.11.1.02.
91. Kim M.N., Ko Y.J., Seong M.W., Kim J.S., Shin B.M., Sung H. Analytical and Clinical Validation of Six Commercial Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus RNA Detection Kits Based on Real-Time Reverse-Transcription PCR. *Annals of Laboratory Medicine*. 2016. V. 36 (5). P. 450-6. doi: 10.3343/alm.2016.36.5.450.
92. Kim S.H., Chang S.Y., Sung M., Park J.H., Bin Kim H., Lee H., Choi J.P., Choi W.S., Min J.Y. Extensive Viable Middle East Respiratory Syndrome (MERS) Coronavirus Contamination in Air and Surrounding Environment in MERS Isolation Wards. *Clinical Infectious Diseases*. 2016. V. 63 (3). P. 363-9. doi: 10.1093/cid/ciw239.
93. Kirchdoerfer R.N., Ward A.B. Structure of the SARS-CoV nsp12 polymerase bound to nsp7 and nsp8 co-factors. *Nature Communications*. 2019. V. 10 (1). P. 2342. doi: 10.1038/s41467-019-10280-3.
94. Kivistö I., Tidenberg E.M., Lilley T., Suominen K., Forbes K.M., Vapalahti O., Huovilainen A., Sironen T. First Report of Coronaviruses in Northern European Bats. *Vector Borne Zoonotic Diseases*. 2020. V. 20 (2). P. 155-158. doi: 10.1089/vbz.2018.2367.
95. Korea Centers for Disease Control and Prevention. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Outbreak in the Republic of Korea, 2015. *Osong Public Health Res Perspect*. 2015. V.6(4). P.269-278. doi: 10.1016/j.phrp.2015.08.006
96. Kuluev B.R., Baymiev An.Kh., Chemeris D.A., Matniyazov R.T., Gerashchenkov G.A., Nikonorov Yu.M., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. The application of the CRISPR loci not for editing of genomes. *Biomics*. 2017. V.9 (3). P. 271-283. (In Russian).
97. Kumar S, Maurya VK, Prasad AK, Bhatt MLB, Saxena SK. Structural, glycosylation and antigenic variation between 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) and SARS coronavirus (SARS-CoV). *Virusdisease*. 2020. V.31(1). P.13-21. doi: 10.1007/s13337-020-00571-5.
98. Kurup V.M., Thomas J. Edible vaccines: Promises and challenges. *Molecular Biotechnology*. 2020. V.62 (2). P. 79-90. doi: 10.1007/s12033-019-00222-1.
99. Kwoh D.Y., Davis G.R., Whitfield K.M., Chappelle H.L., DiMichele L.J., Gingeras T.R. Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989. V. 86 (4). P. 1173-7. doi: 10.1073/pnas.86.4.1173.
100. Lai M.Y., Cheng P.K., Lim W.W. Survival of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Clinical Infectious Diseases*. 2005. V. 41 (7). e67-71. doi: 10.1086/433186.
101. Lam T.T., Shum M.H., Zhu H.C., Tong Y.G., Ni X.B., Liao Y.S., Wei W., Cheung W.Y., Li W.J., Li L.F., Leung G.M., Holmes E.C., Hu Y.L., Guan Y. Identifying SARS-CoV-2 related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature*. 2020. doi: 10.1038/s41586-020-2169-0.
102. Lan J., Ge J., Yu J., Shan S., Zhou H., Fan S., Zhang Q., Shi X., Wang Q., Zhang L., Wang X. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*. 2020. doi: 10.1038/s41586-020-2180-5.
103. Lau L.T., Fung Y.W., Wong F.P., Lin S.S., Wang C.R., Li H.L., Dillon N., Collins R.A., Tam J.S., Chan P.K., Wang C.G., Yu A.C. A real-time PCR for SARS-coronavirus incorporating target gene pre-amplification. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003. V. 312 (4). P. 1290-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.11.064.
104. Lau S.K., Woo P.C., Li K.S., Huang Y., Tsoi H.W., Wong B.H., Wong S.S., Leung S.Y., Chan K.H., Yuen K.Y. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102 (39). P. 14040-5. doi: 10.1073/pnas.0506735102.
105. Lee M, Seo D.J., Seo J., Oh H., Jeon S.B., Ha S.D., Myoung J., Choi I.S., Choi C. Detection of viable murine norovirus using the plaque assay and propidium-monoazide-combined real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Virology Methods*. 2015. V. 221. P. 57-61. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.04.018.
106. Lee SH, Baek YH, Kim YH, Choi YK, Song MS, Ahn JY. One-Pot Reverse Transcriptional Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for Detecting MERS-CoV. *Front Microbiol*. 2017. V.7. 2166. doi: 10.3389/fmicb.2016.02166.
107. Lefkowitz E.J., Dempsey D.M., Hendrickson R.C., Orton R.J., Siddell S.G., Smith D.B. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Research*. 2018. V. 46. P. D708-D717. doi: 10.1093/nar/gkx932.
108. Leifels M., Jurzik L., Wilhelm M., Hamza I.A. Use of ethidium monoazide and propidium monoazide to determine viral infectivity upon inactivation by heat, UV- exposure and chlorine. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2015. V. 218 (8). P. 686-93. doi: 10.1016/j.ijheh.2015.02.003. Erratum in: *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2016. V. 219 (2). P. 232.
109. Li D., Wang D., Dong J., Wang N., Huang H., Xu H., Xia C. False-Negative Results of Real-Time Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2: Role of

- Deep-Learning-Based CT Diagnosis and Insights from Two Cases. *Korean Journal of Radiology*. 2020. V. 21 (4). P. 505-508. doi: 10.3348/kjr.2020.0146.
- 110.Li W., Moore M.J., Vasilieva N., Sui J., Wong S.K., Berne M.A., Somasundaran M., Sullivan J.L., Luzuriaga K., Greenough T.C., Choe H., Farzan M. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*. 2003. V. 426 (6965). P. 450-4.
- 111.Li W., Shi Z., Yu M., Ren W., Smith C., Epstein J.H., Wang H., Crameri G., Hu Z., Zhang H., Zhang J., McEachern J., Field H., Daszak P., Eaton B.T, Zhang S., Wang L.F. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science*. 2005. V. 310 (5748). P. 676-9. doi: 10.1126/science.1118391.
- 112.Liu L., Wang T., Lu J. The prevalence, origin, and prevention of six human coronaviruses. *Virologica Sinica*. 2016. V. 31 (1). P. 94-9. doi: 10.1007/s12250-015-3687-z.
- 113.Liu R., Han H., Liu F., Lv Z., Wu K., Liu Y., Feng Y., Zhu C. Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020. *Clinica Chimica Acta*. 2020. V. 505. P. 172-175. doi: 10.1016/j.cca.2020.03.009.
- 114.Liu S.L., Saif L.J., Weiss S.R., Su L. No credible evidence supporting claims of the laboratory engineering of SARS-CoV-2. *Emerging Microbes Infection*. 2020. V. 9 (1). P. 505-507. doi: 10.1080/22221751.2020.1733440.
- 115.Liu Z., Xiao X., Wei X., Li J., Yang J., Tan H., Zhu J., Zhang Q., Wu J., Liu L. Composition and divergence of coronavirus spike proteins and host ACE2 receptors predict potential intermediate hosts of SARS-CoV-2. *Journal of Medical Virology*. 2020. doi: 10.1002/jmv.25726.
- 116.Lodder W., de Roda Husman A.M. SARS-CoV-2 in Wastewater: Potential Health Risk, but Also Data Source. *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*. 2020. S2468-1253(20)30087-X. doi: 10.1016/S2468-1253(20)30087-X.
- 117.Long C., Xu H., Shen Q., Zhang X., Fan B., Wang C., Zeng B., Li Z., Li X., Li H. Diagnosis of the Coronavirus disease (COVID-19): rRT-PCR or CT? *European Journal of Radiology*. 2020. V. 126. P. 108961. doi: 10.1016/j.ejrad.2020.108961.
- 118.Lu H., Zhao Y., Zhang J., Wang Y., Li W., Zhu X., Sun S., Xu J., Ling L., Cai L., Bu D., Chen R. Date of origin of the SARS coronavirus strains. *BMC Infectious Disease*. 2004. V. 4. P. 3. doi: 10.1186/1471-2334-4-3.
- 119.Lu R., Wu X., Wan Z., Li Y., Zuo L., Qin J., Jin X., Zhang C. Development of a Novel Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of SARS-CoV-2. *Virologica Sinica*. 2020. doi: 10.1007/s12250-020-00218-1.
- 120.Lu R., Yu X., Wang W., Duan X., Zhang L., Zhou W., Xu J., Xu L., Hu Q., Lu J., Ruan L., Wang Z., Tan W. Characterization of human coronavirus etiology in Chinese adults with acute upper respiratory tract infection by real-time RT-PCR assays. *PLoS One*. 2012. V. 7 (6). e38638. doi: 10.1371/journal.pone.0038638.
- 121.Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., Wang W., Song H., Huang B., Zhu N., Bi Y., Ma X., Zhan F., Wang L., Hu T., Zhou H., Hu Z., Zhou W., Zhao L., Chen J., Meng Y., Wang J., Lin Y., Yuan J., Xie Z., Ma J., Liu W.J., Wang D., Xu W., Holmes E.C., Gao G.F., Wu G., Chen W., Shi W., Tan W. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020. V. 395 (10224). P. 565-574. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
- 122.Lu X., Whitaker B., Sakthivel S.K., Kamili S., Rose L.E., Lowe L., Mohareb E., Ellassal E.M., Al-sanouri T., Haddadin A., Erdman D.D. Real-time reverse transcription-PCR assay panel for Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014. V. 52 (1). P. 67-75. doi: 10.1128/JCM.02533-13.
- 123.Luk H.K.H., Li X., Fung J., Lau S.K.P., Woo P.C.Y. Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of SARS coronavirus. *Infection, Genetics and Evolution*. 2019. V. 71. P. 21-30. doi: 10.1016/j.meegid.2019.03.001.
- 124.Mallapaty S. How sewage could reveal true scale of coronavirus outbreak. *Nature*. 2020. V. 580 (7802). P. 176-177. doi: 10.1038/d41586-020-00973-x.
- 125.Marra M.A., Jones S.J., Astell C.R., Holt R.A., Brooks-Wilson A., Butterfield Y.S., Khattra J., Asano J.K., Barber S.A., Chan S.Y., Cloutier A., Coughlin S.M., Freeman D., Girn N., Griffith O.L., Leach S.R., Mayo M., McDonald H, Montgomery SB, Pandoh PK, Petrescu AS, Robertson AG, Schein JE, Siddiqui A, Smailus DE, Stott J.M., Yang G.S., Plummer F., Andonov A., Artsob H., Bastien N., Bernard K., Booth T.F., Bowness D., Czub M., Drebot M., Fernando L., Flick R., Garbutt M., Gray M., Grolla A., Jones S., Feldmann H., Meyers A., Kabani A., Li Y., Normand S., Stroher U., Tipples G.A., Tyler S., Vogrig R., Ward D., Watson B., Brunham R.C., Krajden M., Petric M., Skowronski D.M., Upton C., Roper R.L. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science*. 2003. V. 300 (5624). P. 1399-404. doi: 10.1126/science.1085953.
- 126.Martin J.E., Louder M.K., Holman L.A., Gordon I.J., Enama M.E., Larkin B.D., Andrews C.A., Vogel L., Koup R.A., Roederer M., Bailer R.T., Gomez P.L., Nason M., Mascola J.R., Nabel G.J., Graham B.S. A

- SARS DNA vaccine induces neutralizing antibody and cellular immune responses in healthy adults in a Phase I clinical trial. *Vaccine*. 2008. V. 26 (50). P. 6338-43. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.09.026.
127. Medema G., Heijnen L., Elsinga G., Italiaander R. Presence of SARS-Coronavirus-2 in sewage. *medRxiv preprint*. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.29.20045880>.
128. Menachery V.D., Yount B.L. Jr., Debbink K., Agnihotram S., Gralinski L.E., Plante J.A., Graham R.L., Scobey T., Ge X.Y., Donaldson E.F., Randell S.H., Lanzavecchia A., Marasco W.A., Shi Z.L., Baric R.S. A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nature Medicine*. 2015. V. 21 (12). P. 1508-13. doi: 10.1038/nm.3985.
129. Minskaia E., Hertzog T., Gorbalenya A.E., Campanacci V., Cambillau C., Canard B., Ziebuhr J. Discovery of an RNA virus 3'->5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103 (13). P. 5108-13. doi: 10.1073/pnas.0508200103.
130. Mitani Y., Lezhava A., Kawai Y., Kikuchi T., Oguchi-Katayama A., Kogo Y., Itoh M., Miyagi T., Takakura H., Hoshi K., Kato C., Arakawa T., Shibata K., Fukui K., Masui R., Kuramitsu S., Kiyotani K., Chalk A., Tsunekawa K., Murakami M., Kamataki T., Oka T., Shimada H., Cizdziel PE, Hayashizaki Y. Rapid SNP diagnostics using asymmetric isothermal amplification and a new mismatch-suppression technology. *Nat. Methods*. 2007. V.4(3). P.257-262. DOI: 10.1038/nmeth1007.
131. Modjarrad K., Roberts C.C., Mills K.T., Castellano A.R., Paolino K., Muthumani K., Reuschel E.L., Robb M.L., Racine T., Oh M.D., Lamarre C., Zaidi F.I., Boyer J., Kudchodkar S.B., Jeong M., Darden J.M., Park Y.K., Scott P.T., Remigio C., Parikh A.P., Wise M.C., Patel A., Duperret E.K., Kim K.Y., Choi H., White S., Bagarazzi M., May J.M., Kane D., Lee H., Kobinger G., Michael N.L., Weiner D.B., Thomas S.J., Maslow J.N. Safety and immunogenicity of an anti-Middle East respiratory syndrome coronavirus DNA vaccine: a phase 1, open-label, single-arm, dose-escalation trial. *Lancet Infectious Disease*. 2019. V. 19 (9). P. 1013-1022. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30266-X.
132. Mohamed D.H., Al-Hetheel A.F., Mohamud H.S., Aldosari K., Alzamil F.A., Somily A.M. Clinical validation of 3 commercial real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction assays for the detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus from upper respiratory tract specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*. 2017. V. 87 (4). P. 320-324. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.01.003.
133. Moreno A., Lelli D., de Sabato L., Zaccaria G., Boni A., Sozzi E., Prosperi A., Lavazza A., Cella E., Castrucci M.R., Ciccozzi M., Vaccari G. Detection and full genome characterization of two beta CoV viruses related to Middle East respiratory syndrome from bats in Italy. *Virology Journal*. 2017. V. 14 (1). P. 239. doi: 10.1186/s12985-017-0907-1.
134. Muth D, Corman VM, Roth H, Binger T, Dijkman R, Gottula LT, Gloza-Rausch F, Balboni A, Battilani M, Rihtarič D, Toplak I, Ameneiros RS, Pfeifer A, Thiel V, Drexler JF, Müller MA, Drosten C. Attenuation of replication by a 29 nucleotide deletion in SARS-coronavirus acquired during the early stages of human-to-human transmission. *Sci Rep*. 2018. V.8(1). 15177. DOI: 10.1038/s41598-018-33487-8.
135. Muthumani K., Falzarano D., Reuschel E.L., Tingey C., Flingai S., Villarreal D.O., Wise M., Patel A., Izmirly A., Aljuaid A., Seliga A.M., Soule G., Morrow M., Kraynyak K.A., Khan A.S., Scott D.P., Feldmann F., LaCasse R., Meade-White K., Okumura A., Ugen K.E., Sardesai N.Y., Kim J.J., Kobinger G., Feldmann H., Weiner D.B. A synthetic consensus anti-spike protein DNA vaccine induces protective immunity against Middle East respiratory syndrome coronavirus in nonhuman primates. *Science Translational Medicine*. 2015. V. 7 (301). P. 301ra132. doi: 10.1126/scitranslmed.aac7462.
136. Ng O.W., Tan Y.J. Understanding bat SARS-like coronaviruses for the preparation of future coronavirus outbreaks - Implications for coronavirus vaccine development. *Human Vaccine Immunotherapy*. 2017. V. 13 (1). P. 186-189. doi: 10.1080/21645515.2016.1228500.
137. Nguyen T., Duong Bang D., Wolff A. 2019 Novel Coronavirus Disease (COVID-19): Paving the Road for Rapid Detection and Point-of-Care Diagnostics. *Micromachines (Basel)*. 2020. V. 11 (3). pii: E306. doi: 10.3390/mi11030306.
138. Niu P., Shen J., Zhu N., Lu R., Tan W. Two-tube multiplex real-time reverse transcription PCR to detect six human coronaviruses. *Virologica Sinica*. 2016. V. 31 (1). P. 85-8. doi: 10.1007/s12250-015-3653-9.
139. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000. V.28(12). E63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63.
140. Ogando NS, Ferron F, Decroly E, Canard B, Posthuma CC, Snijder EJ. The Curious Case of the Nidovirus Exoribonuclease: Its Role in RNA Synthesis and Replication Fidelity. *Front Microbiol*. 2019. V.10. 1813. doi: 10.3389/fmicb.2019.01813.
141. Okada P., Buathong R., Phuygun S., Thanadachakul T., Parnmen S., Wongboot W., Waicharoen S., Wacharapluesadee S., Uttayamakul S., Vachiraphan A., Chittaganpitch M., Mekha N., Janejai N.,

- Iamsirithaworn S., Lee R.T., Maurer-Stroh S. Early transmission patterns of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in travellers from Wuhan to Thailand, January 2020. *Euro Surveillance*. 2020, V. 25 (8). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.8.2000097.
142. Onishchenko G.G., Govorun V.M., Sergienko V.I., Akopian T.A., Momynaliev K.T., Vereshchagin V.A., Lazarev V.N., Vasilev N.T., Markov V.I., Merkulov V.A., Maksimov V.A., Melnikov V.A., Lopukhin Y.M. Structural organization of the genome of SARS-associated coronavirus (Strain SoD) isolated on the territory of the Russian Federation. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2004. V. 137 (2). P. 197-9. doi: 10.1023/b:bebm.0000028139.02582.97 [article in English, Russian].
143. Oristo S., Lee H.J., Maunula L. Performance of pre-RT-qPCR treatments to discriminate infectious human rotaviruses and noroviruses from heat-inactivated viruses: applications of PMA/PMAxx, benzonase and RNase. *Journal of Applied Microbiology*. 2018. V. 124 (4). p. 1008-1016. doi: 10.1111/jam.13737.
144. Ortega J.T., Serrano M.L., Pujol F.H., Rangel H.R. Role of changes in SARS-CoV-2 spike protein in the interaction with the human ACE2 receptor: An in silico analysis. *EXCLI Journal*. 2020. V. 19. P. 410-417. doi: 10.17179/excli2020-1167.
145. Paraskevis D., Kostaki E.G., Magiorkinis G., Panayiotakopoulos G., Sourvinos G., Tsiodras S. Full-genome evolutionary analysis of the novel corona virus (2019-nCoV) rejects the hypothesis of emergence as a result of a recent recombination event. *Infection, Genetics and Evolution*. 2020. V. 79. P. 104212. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104212.
146. Parshionikar S., Laseke I., Fout G.S. Use of propidium monoazide in reverse transcriptase PCR to distinguish between infectious and noninfectious enteric viruses in water samples. *Applied Environmental Microbiology*. 2010. V. 76 (13). P. 4318-26. doi: 10.1128/AEM.02800-09.
147. Pas S.D., Patel P., Reusken C., Domingo C., Corman V.M., Drosten C., Dijkman R., Thiel V., Nowotny N., Koopmans M.P., Niedrig M. First international external quality assessment of molecular diagnostics for Mers-CoV. *Journal of Clinical Virology*. 2015. V. 69. P. 81-5. doi: 10.1016/j.jcv.2015.05.022.
148. Peiris J.S., Lai S.T., Poon L.L., Guan Y., Yam L.Y., Lim W., Nicholls J., Yee W.K., Yan W.W., Cheung M.T., Cheng V.C., Chan K.H., Tsang D.N., Yung R.W., Ng T.K., Yuen K.Y. SARS study group. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*. 2003. V. 361 (9366). P. 1319-25. doi: 10.1016/s0140-6736(03)13077-2.
149. Petrushina I., Hovakimyan A., Harahap-Carrillo I.S., Davtyan H., Antonyan T., Chailyan G., Kazarian K., Antonenko M., Jullienne A., Hamer M.M., Obenaus A., King O., Zagorski K., Blurton-Jones M., Cribbs D.H., Lander H., Ghochikyan A., Agadjanyan M.G. Characterization and preclinical evaluation of the cGMP grade DNA based vaccine, AV-1959D to enter the first-in-human clinical trials. *Neurobiology Diseases*. 2020. V. 139. 104823. doi: 10.1016/j.nbd.2020.104823.
150. Petukhova N.V., Ivanov P.A., Migunov A.I. Virus-like particles are a new strategy for creating influenza vaccines. *Questions of virology*. 2013. V. 58 (2). P. 10-14.
151. Pfefferle S., Reucher S., Nörz D., Lütgehetmann M. Evaluation of a quantitative RT-PCR assay for the detection of the emerging coronavirus SARS-CoV-2 using a high throughput system. *Euro Surveillance*. 2020. V. 25 (9). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.9.2000152.
152. Pogrebnyak N., Golovkin M., Andrianov V., Spitsin S., Smirnov Y., Egolf R., Koprowski H. Severe acute respiratory syndrome (SARS) S protein production in plants: development of recombinant vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102 (25). P. 9062-7. doi: 10.1073/pnas.0503760102.
153. Poon L.L., Chan K.H., Wong O.K., Cheung T.K., Ng I., Zheng B., Seto W.H., Yuen K.Y., Guan Y., Peiris J.S. Detection of SARS coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome by conventional and real-time quantitative reverse transcription-PCR assays. *Clinical Chemistry*. 2004. V. 50 (1). P. 67-72. doi: 10.1373/clinchem.2003.023663.
154. Poon L.L., Chan K.H., Wong O.K., Yam W.C., Yuen K.Y., Guan Y., Lo Y.M., Peiris J.S. Early diagnosis of SARS coronavirus infection by real time RT-PCR. *Journal of Clinical Virology*. 2003. V. 28 (3). P. 233-8. doi: 10.1016/j.jcv.2003.08.004
155. Poon L.L., Wong B.W., Chan K.H., Leung C.S., Yuen K.Y., Guan Y., Peiris J.S. A one step quantitative RT-PCR for detection of SARS coronavirus with an internal control for PCR inhibitors. *Journal of Clinical Virology*. 2004a. V. 30 (3). P. 214-7. doi: 10.1016/j.jcv.2003.12.007.
156. Poon L.L., Wong B.W., Chan K.H., Ng S.S., Yuen K.Y., Guan Y., Peiris J.S. Evaluation of real-time reverse transcriptase PCR and real-time loop-mediated amplification assays for severe acute respiratory syndrome coronavirus detection. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005. V. 43 (7). P. 3457-9. doi: 10.1128/JCM.43.7.3457-3459.2005.
157. Pyankov O.V., Bodnev S.A., Pyankova O.G., Agranovski I.E. Survival of aerosolized coronavirus in the ambient air. *Journal of Aerosol Science*. 2018. V. 115. P. 158-163. doi: 10.1016/j.jaerosci.2017.09.009.
158. Qinfen Z., Jinming C., Xiaojun H., Huanying Z., Jicheng H., Ling F., Kunpeng L., Jingqiang Z. The life cycle of SARS coronavirus in Vero E6 cells. *Journal of*

- Medical Virology*. 2004. V. 73 (3). P. 332-7. doi: 10.1002/jmv.20095.
159. Qiu Y., Zhao Y.B., Wang Q., Li J.Y., Zhou Z.J., Liao C.H., Ge X.Y. Predicting the angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) utilizing capability as the receptor of SARS-CoV-2. *Microbes Infections*. 2020. pii: S1286-4579(20)30049-6. doi: 10.1016/j.micinf.2020.03.003.
160. Qu X.X., Hao P., Song X.J., Jiang S.M., Liu Y.X., Wang P.G., Rao X., Song H.D., Wang S.Y., Zuo Y., Zheng A.H., Luo M., Wang H.L., Deng F., Wang H.Z., Hu Z.H., Ding M.X., Zhao G.P., Deng H.K. Identification of two critical amino acid residues of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for its variation in zoonotic tropism transition via a double substitution strategy. *Journal of Biological Chemistry*. 2005. V. 280 (33). P. 29588-95.
161. Quijada N.M., Fongaro G., Barardi C.R., Hernández M., Rodríguez-Lázaro D. Propidium Monoazide Integrated with qPCR Enables the Detection and Enumeration of Infectious Enteric RNA and DNA Viruses in Clam and Fermented Sausages. *Frontiers in Microbiology*. 2016. V. 7. P. 2008. doi: 10.3389/fmicb.2016.02008.
162. Rabenau H.F., Cinatl J., Morgenstern B., Bauer G., Preiser W., Doerr H.W. Stability and inactivation of SARS coronavirus. *Medical Microbiology and Immunology*. 2005. V. 194 (1-2). P. 1-6.
163. Rota P.A., Oberste M.S., Monroe S.S., Nix W.A., Campagnoli R., Icenogle J.P., Peñaranda S., Bankamp B., Maher K., Chen M.H., Tong S., Tamin A., Lowe L., Frace M., DeRisi J.L., Chen Q., Wang D., Erdman D.D., Peret T.C., Burns C., Ksiazek T.G., Rollin P.E., Sanchez A., Liffick S., Holloway B., Limor J., McCaustland K., Olsen-Rasmussen M., Fouchier R., Günther S., Osterhaus A.D., Drosten C., Pallansch M.A., Anderson L.J., Bellini W.J. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science*. 2003. V. 300 (5624). P. 1394-9. doi: 10.1126/science.1085952.
164. Rutschke N., Zimmermann J., Möller R., Klöck G., Winterhalter M., Leune A. Hot start reverse transcriptase: an approach for improved real-time RT-PCR performance. *J. Anal. Sci. Technol.* 2015. V. 6 (1). P. 20. doi: 10.1186/s40543-015-0063-4.
165. Rybicki E.P. Plant molecular farming of virus-like nanoparticles as vaccines and reagents. *Wiley Interdisciplinary Reviews Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2020. V. 12 (2). e1587. doi: 10.1002/wnan.1587.
166. Sanjuán R, Nebot MR, Chirico N, Mansky LM, Belshaw R. Viral mutation rates. *J Virol*. 2010. V.84(19). P.9733-9748. DOI: 10.1128/JVI.00694-10.
167. Scobey T., Yount B.L., Sims A.C., Donaldson E.F., Agnihothram S.S., Menachery V.D., Graham R.L., Swanstrom J., Bove P.F., Kim J.D., Grego S., Randell S.H., Baric R.S. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110 (40). P. 16157-62. doi: 10.1073/pnas.1311542110.
168. Scotti N., Rybicki E.P. Virus-like particles produced in plants as potential vaccines. *Expert Reviews of Vaccines*. 2013. V. 12 (2). P. 211-24. doi: 10.1586/erv.12.147.
169. Seong M.W., Kim S.Y., Corman V.M., Kim T.S., Cho S.I., Kim M.J., Lee S.J., Lee J.S., Seo S.H., Ahn J.S., Yu B.S., Park N., Oh M.D., Park W.B., Lee J.Y., Kim G., Joh J.S., Jeong I., Kim E.C., Drosten C., Park S.S. Microevolution of Outbreak-Associated Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus, South Korea, 2015. *Emerging Infectious Diseases*. 2016. V. 22 (2). P. 327-30. doi: 10.3201/eid2202.151700.
170. Sevajol M., Subissi L., Decroly E., Canard B., Imbert I. Insights into RNA synthesis, capping, and proofreading mechanisms of SARS-coronavirus. *Virus Research*. 2014. V. 194. P. 90-9. doi: 10.1016/j.virusres.2014.10.008.
171. Shang J., Ye G., Shi K., Wan Y., Luo C., Aihara H., Geng Q., Auerbach A., Li F. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*. 2020. doi: 10.1038/s41586-020-2179-y.
172. Sheahan T.P., Baric R.S. Is regulation preventing the development of therapeutics that may prevent future coronavirus pandemics? *Future Virology*. 2018. V. 13 (3). P. 143-146. doi: 10.2217/fvl-2017-0143.
173. Sheridan C. Coronavirus and the race to distribute reliable diagnostics. *Nat Biotechnol*. 2020. V.38(4). P.382-384. DOI: 10.1038/d41587-020-00002-2.
174. Shi R., Ma W., Wu Q., Zhang B., Song Y., Guo Q., Xiao W., Wang Y., Zheng W. Design and application of 60mer oligonucleotide microarray in SARS coronavirus detection. *Chinese Scientific Bulletin*. 2003. V. 48 (12). P. 1165-1169. doi: 10.1007/BF03183928.
175. Shirato K., Nao N., Matsuyama S., Kageyama T. An ultra-rapid real-time RT-PCR method for detecting Middle East respiratory syndrome coronavirus using a mobile PCR device, PCR1100. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2019. doi: 10.7883/yoken.JJID.2019.400.
176. Shirato K., Yano T., Senba S., Akachi S., Kobayashi T., Nishinaka T., Notomi T., Matsuyama S. Detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Virology Journal*. 2014. V. 11. P. 139. doi: 10.1186/1743-422X-11-139.
177. Sohrab S.S., Suhail M., Kamal M.A., Husen A., Azhar E.I. Recent development and future prospects of plant-based vaccines. *Current Drug Metabolism*. 2017.

- V. 18 (9). P. 831-841. doi: 10.2174/1389200218666170711121810.
178. Song H.D., Tu C.C., Zhang G.W., Wang S.Y., Zheng K., Lei L.C., Chen Q.X., Gao Y.W., Zhou H.Q., Xiang H., Zheng H.J., Chern S.W., Cheng F., Pan C.M., Xuan H., Chen S.J., Luo H.M., Zhou D.H., Liu Y.F., He J.F., Qin P.Z., Li L.H., Ren Y.Q., Liang W.J., Yu Y.D., Anderson L., Wang M., Xu R.H., Wu X.W., Zheng H.Y., Chen J.D., Liang G., Gao Y., Liao M., Fang L., Jiang L.Y., Li H., Chen F., Di B., He L.J., Lin J.Y., Tong S., Kong X., Du L., Hao P., Tang H., Bernini A., Yu X.J., Spiga O., Guo Z.M., Pan H.Y., He W.Z., Manuguerra J.C., Fontanet A., Danchin A., Niccolai N., Li Y.X., Wu C.I., Zhao G.P. Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102 (7). P. 2430-5. doi: 10.1073/pnas.0409608102.
179. Su YCF, Anderson DE, Young BE, Zhu F, Linster M, Kalimuddin S., Low JGH, Yan Z, Jayakumar J, Sun L, Yan GZ, Mendenhall IH, Leo Y.-S., Lye DC, Wang L-F., Smith GJD. Discovery of a 382-nt deletion during the early evolution of SARS-CoV-2. *bioRxiv*. 2020 DOI: 10.1101/2020.03.11.987222.
180. Subissi L, Posthuma CC, Collet A, Zevenhoven-Dobbe JC, Gorbalenya AE, Decroly E, Snijder EJ, Canard B, Imbert I. One severe acute respiratory syndrome coronavirus protein complex integrates processive RNA polymerase and exonuclease activities. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014. V.111(37). E3900-9. DOI: 10.1073/pnas.1323705111.
181. te Velthuis A.J., Arnold J.J., Cameron C.E., van den Worm S.H., Snijder E.J. The RNA polymerase activity of SARS-coronavirus nsp12 is primer dependent. *Nucleic Acids Research*. 2010. V. 38 (1). P. 203-14. doi: 10.1093/nar/gkp904.
182. The Chinese SARS Molecular Epidemiology Consortium. Molecular evolution of the SARS coronavirus during the course of the SARS epidemic in China. *Science*. 2004. V.303(5664). P.1666-1669. DOI: 10.1126/science.1092002.
183. Tong S., Conrardy C., Ruone S., Kuzmin I.V., Guo X., Tao Y., Niezgodna M., Haynes L., Agwanda B., Breiman R.F., Anderson L.J., Rupprecht C.E. Detection of novel SARS-like and other coronaviruses in bats from Kenya. *Emerging Infectious Diseases*. 2009. V. 15 (3). P. 482-5. doi: 10.3201/eid1503.081013.
184. Tsui SK, Chim SS, Lo YM; Chinese University of Hong Kong Molecular SARS Research Group. Coronavirus genomic-sequence variations and the epidemiology of the severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*. 2003. V.349(2). P.187-188. DOI: 10.1056/NEJM200307103490216.
185. van Boheemen S., de Graaf M., Lauber C., Bestebroer T.M., Raj V.S., Zaki A.M., Osterhaus A.D., Haagmans B.L., Gorbalenya A.E., Snijder E.J., Fouchier R.A. Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *mBio*. 2012. V. 3 (6). pii: e00473-12. doi: 10.1128/mBio.00473-12.
186. van Doremalen N., Bushmaker T., Morris D.H., Holbrook M.G., Gamble A., Williamson B.N., Tamin A., Harcourt J.L., Thornburg N.J., Gerber S.I., Lloyd-Smith J.O., de Wit E., Munster V.J. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *New England Journal of Medicine*. 2020. V. 382 (16). P. 1564-1567. doi: 10.1056/NEJMc2004973.
187. van Doremalen N., Bushmaker T., Munster V.J. Stability of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) under different environmental conditions. *Euro Surveill*. 2013. V. 18 (38). pii: 20590. doi: 10.2807/1560-7917.es2013.18.38.20590.
188. Vershinina Z.R., Kuluev B.R., Maksimov I.V., Mikhaylova, E.V., Gumerova G.R., Maleev G.V., Knyazev A.V., Baymiev An.Kh., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. To prohibit GMOs impossible to resolve! *Biomics*. 2020. V. 12 (1). P. 80-120. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-6 (In Russian).
189. Vijgen L., Moës E., Keyaerts E., Li S., Van Ranst M. A pancoronavirus RT-PCR assay for detection of all known coronaviruses. *Methods in Molecular Biology*. 2008. V. 454. P. 3-12. doi: 10.1007/978-1-59745-181-9_1.
190. Walker P.J., Siddell S.G., Lefkowitz E.J., Mushegian A.R., Dempsey D.M., Dutilh B.E., Harrach B., Harrison R.L., Hendrickson R.C., Junglen S., Knowles N.J., Kropinski A.M., Krupovic M., Kuhn J.H., Nibert M., Rubino L., Sabanadzovic S., Simmonds P., Varsani A., Zerbini F.M., Davison A.J. Changes to virus taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2019). *Archives of Virology*. 2019. V. 164 (9). P. 2417-2429. doi: 10.1007/s00705-019-04306-w.
191. Wang B., Potter S.J., Lin Y., Cunningham A.L., Dwyer D.E., Su Y., Ma X., Hou Y., Saksena N.K. Rapid and sensitive detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by rolling circle amplification. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005. V. 43 (5). P. 2339-44. doi: 10.1128/JCM.43.5.2339-2344.2005.
192. Wang C., Liu Z., Chen Z., Huang X., Xu M., He T., Zhang Z. The establishment of reference sequence for SARS-CoV-2 and variation analysis. *Journal of Medical Virology*. 2020. V. doi: 10.1002/jmv.25762.
193. Wang L., Fu S., Cao Y., Zhang H., Feng Y., Yang W., Nie K., Ma X., Liang G. Discovery and genetic analysis of novel coronaviruses in least horseshoe bats in southwestern China. *Emerging Microbes and*

- Infections*. 2017. V. 6 (3). e14. doi: 10.1038/emi.2016.140.
194. Wang X.W., Li J., Guo T., Zhen B., Kong Q., Yi B., Li Z., Song N., Jin M., Xiao W., Zhu X., Gu C., Yin J., Wei W., Yao W., Liu C., Li J., Ou G., Wang M., Fang T., Wang G., Qiu Y., Wu H., Chao F., Li J. Concentration and detection of SARS coronavirus in sewage from Xiao Tang Shan Hospital and the 309th Hospital of the Chinese People's Liberation Army. *Water Science and Technology*. 2005. V. 52 (8). P. 213-21. doi: 10.2166/wst.2005.0266
195. Wölfel R., Corman V.M., Guggemos W., Seilmaier M., Zange S., Müller M.A., Niemeyer D., Jones T.C., Vollmar P., Rothe C., Hoelscher M., Bleicker T., Brünink S., Schneider J., Ehmann R., Zwirgmaier K., Drosten C., Wendtner C. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. 2020. doi: 10.1038/s41586-020-2196-x.
196. Woo P.C., Lau S.K., Tsoi H.W., Chen Z.W., Wong B.H., Zhang L., Chan J.K., Wong L.P., He W., Ma C., Chan K.H., Ho D.D., Yuen K.Y. SARS coronavirus spike polypeptide DNA vaccine priming with recombinant spike polypeptide from *Escherichia coli* as booster induces high titer of neutralizing antibody against SARS coronavirus. *Vaccine*. 2005. V. 23 (42). P. 4959-68. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.05.023.
197. Wrapp D., Wang N., Corbett K.S., Goldsmith J.A., Hsieh C.L., Abiona O., Graham B.S., McLellan J.S. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. 2020. V. 367 (6483). P. 1260-1263. doi: 10.1126/science.abb2507.
198. Wu F., Zhao S., Yu B., Chen Y.M., Wang W., Song Z.G., Hu Y., Tao Z.W., Tian J.H., Pei Y.Y., Yuan M.L., Zhang Y.L., Dai F.H., Liu Y., Wang Q.M., Zheng J.J., Xu L., Holmes E.C., Zhang Y.Z. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020. V. 579 (7798). P. 265-269. doi: 10.1038/s41586-020-2008-3.
199. Wu F.Q., Xiao A., Zhang J.B., Gu X.Q., Lee W.L., Kauffman K., Hanage W.P., Matus M., Ghaeli N., Endo N., Duvallet C., Moniz K., Erickson T.B., Chai P.R., Thompson J., Alm E.J. SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. *medRxiv preprint*. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.05.20051540>.
200. Wu Q., Xu Z., Wei T., Zeng H., Li J., Gang H., Sun M., Jiang F., Wang X., Dong W., Yang L., Wang J. Development of Taqman RT-nested PCR system for clinical SARS-CoV detection. *Journal of Virology Methods*. 2004. V. 119 (1). P. 17-23. doi: 10.1016/j.jviromet.2004.02.011
201. Wu X., Cheng G., Di B., Yin A., He Y., Wang M., Zhou X., He L., Luo K., Du L. Establishment of a fluorescent polymerase chain reaction method for the detection of the SARS-associated coronavirus and its clinical application. *Chinese Medical Journal*. 2003. V. 116 (7). P. 988-990.
202. Xie C., Jiang L., Huang G., Pu H., Gong B., Lin H., Ma S., Chen X., Long B., Si G., Yu H., Jiang L., Yang X., Shi Y., Yang Z. Comparison of different samples for 2019 novel coronavirus detection by nucleic acid amplification tests. *International Journal of Infectious Diseases*. 2020. V. 93. P. 264-267. doi: 10.1016/j.ijid.2020.02.050.
203. Xie Q., Cao Y., Su J., Wu X., Wan C., Ke C., Zhao W., Zhang B. Genomic sequencing and analysis of the first imported Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS CoV) in China. *Science China Life Sciences*. 2015. V. 58 (8). P. 818-20. doi: 10.1007/s11427-015-4903-7.
204. Xie X., Zhong Z., Zhao W., Zheng C., Wang F., Liu J. Chest CT for Typical 2019-nCoV Pneumonia: Relationship to Negative RT-PCR Testing. *Radiology*. 2020. 200343. doi: 10.1148/radiol.2020200343.
205. Yam W.C., Chan K.H., Poon L.L., Guan Y., Yuen K.Y., Seto W.H., Peiris J.S. Evaluation of reverse transcription-PCR assays for rapid diagnosis of severe acute respiratory syndrome associated with a novel coronavirus. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003. V. 41 (10). P. 4521-4. doi: 10.1128/jcm.41.10.4521-4524.2003.
206. Yang D., Leibowitz J.L. The structure and functions of coronavirus genomic 3' and 5' ends. *Virus Research*. 2015. V. 206. P. 120-33. doi: 10.1016/j.virusres.2015.02.025.
207. Yan R., Zhang Y., Li Y., Xia L., Guo Y., Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*. 2020. V.367(6485). P.1444-1448. DOI: 10.1126/science.abb2762.
208. Yang Z.Y., Kong W.P., Huang Y., Roberts A., Murphy B.R., Subbarao K., Nabel G.J. A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice. *Nature*. 2004. V. 428 (6982). P. 561-4. doi: 10.1038/nature02463.
209. Yaren O., Glushakova L.G., Bradley K.M., Hoshika S., Benner S.A. Standard and AEGIS nicking molecular beacons detect amplicons from the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Virology Methods*. 2016. V. 236. P. 54-61. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.07.008.
210. Ye Z.W., Yuan S., Yuen K.S., Fung S.Y., Chan C.P., Jin D.Y. Zoonotic origins of human coronaviruses. *International Journal of Biological Sciences*. 2020. V. 16 (10). P. 1686-1697. doi: 10.7150/ijbs.45472.
211. Yip C.C., Ho C.C., Chan J.F., To K.K., Chan H.S., Wong S.C., Leung K.H., Fung A.Y., Ng A.C., Zou Z., Tam A.R., Chung T.W., Chan K.H., Hung I.F., Cheng V.C., Tsang O.T., Tsui S.K.W., Yuen K.Y. Development of a Novel, Genome Subtraction-Derived, SARS-CoV-2-Specific COVID-19-nsp2 Real-Time

- RT-PCR Assay and Its Evaluation Using Clinical Specimens. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. V. 21 (7). pii: E2574. doi: 10.3390/ijms21072574.
212. Yoon I.K., Kim J.H. First clinical trial of a MERS coronavirus DNA vaccine. *The Lancet Infectious Diseases*. 2019. V. 19 (9). P. 924-925. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30397-4.
213. Yount B., Curtis K.M., Fritz E.A., Hensley L.E., Jahrling P.B., Prentice E., Denison M.R., Geisbert T.W., Baric R.S. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100 (22). P. 12995-3000. doi: 10.1073/pnas.1735582100
214. Yu F., Yan L., Wang N., Yang S., Wang L., Tang Y., Gao G., Wang S., Ma C., Xie R., Wang F., Tan C., Zhu L., Guo Y., Zhang F. Quantitative Detection and Viral Load Analysis of SARS-CoV-2 in Infected Patients. *Clinical Infectious Diseases*. 2020. pii: ciaa345. doi: 10.1093/cid/ciaa345.
215. Zakhartchouk A.N., Viswanathan S., Moshynskyy I., Petric M., Babiuk L.A. Optimization of a DNA vaccine against SARS. *DNA and Cell Biology*. 2007. V. 26 (10). P. 721-6. doi: 10.1089/dna.2007.0616.
216. Zaki A.M., van Boheemen S., Bestebroer T.M., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *New England Journal of Medicine*. 2012. V. 367 (19). P. 1814-20. doi: 10.1056/NEJMoa1211721.
217. Zeng F., Chow K.Y., Hon C.C., Law K.M., Yip C.W., Chan K.H., Peiris J.S., Leung F.C. Characterization of humoral responses in mice immunized with plasmid DNAs encoding SARS-CoV spike gene fragments. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004. V. 315 (4). P. 1134-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.01.166.
218. Zhang J., Meng B., Liao D., Zhou L., Zhang X., Chen L., Guo Z., Peng C., Zhu B., Lee P.P., Xu X., Zhou T., Deng Z., Hu Y., Li K. De novo synthesis of PCR templates for the development of SARS diagnostic assay. *Molecular Biotechnology*. 2003. V. 25 (2). P. 107-12. doi: 10.1385/MB:25:2:107.
219. Zhang T., Wu Q., Zhang Z. Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. *Current Biology*. 2020. V. 30 (7). P. 1346-1351.e2. doi: 10.1016/j.cub.2020.03.022.
220. Zhang Y., Qu S., Xu L. Progress in the study of virus detection methods: The possibility of alternative methods to validate virus inactivation. *Biotechnology and Bioengineering*. 2019. V. 116 (8). P. 2095-2102. doi: 10.1002/bit.27003.
221. Zhang Y., Odiwuor N., Xiong J., Sun L., Nyaruaba R.O., Wei H., Tanner N.A. Rapid Molecular Detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) Virus RNA Using Colorimetric LAMP. *medRxiv*. 2020a. doi: 10.1101/2020.02.26.20028373
222. Zhao P., Ke J.S., Qin Z.L., Ren H., Zhao L.J., Yu J.G., Gao J., Zhu S.Y., Qi Z.T. DNA vaccine of SARS-Cov S gene induces antibody response in mice. *Acta Biochimica Biophysica Sinica (Shanghai)*. 2004 Jan;36(1):37-41. doi: 10.1093/abbs/36.1.37.
223. Zhao Z, Li H, Wu X, Zhong Y, Zhang K, Zhang YP, Boerwinkle E, Fu YX. Moderate mutation rate in the SARS coronavirus genome and its implications. *BMC Evol Biol*. 2004. V.4. 21. DOI: 10.1186/1471-2148-4-21.
224. Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Zhao X., Huang B., Shi W., Lu R., Niu P., Zhan F., Ma X., Wang D., Xu W., Wu G., Gao G.F., Tan W. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*. 2020. V. 382 (8). P. 727-733. doi: 10.1056/NEJMoa2001017.
225. Zlateva K.T., Coenjaerts F.E., Crusio K.M., Lammens C., Leus F., Viveen M., Ieven M., Spaan W.J., Claas E.C., Gorbalenya A.E. No novel coronaviruses identified in a large collection of human nasopharyngeal specimens using family-wide CODEHOP-based primers. *Archives of Virology*. 2013. V. 158 (1). P. 251-5. doi: 10.1007/s00705-012-1487-4.
226. Zlateva K.T., Crusio K.M., Leontovich A.M., Lauber C., Claas E., Kravchenko A.A., Spaan W.J., Gorbalenya A.E. Design and validation of consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for broad and sensitive detection of corona- and toroviruses. *Journal of Virology Methods*. 2011. V. 177 (2). P. 174-83. doi: 10.1016/j.jviromet.2011.08.005.