

Л.Ф.Стובה, В.Н.Лебедев, А.А.Петров, В.С.Кулиш, С.В.Борисевич

ДИАГНОСТИКА БЛИЖНЕВОСТОЧНОГО РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА ЧЕЛОВЕКА

ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны, Сергиев Посад, Российская Федерация

Ближневосточный респираторный синдром представляет опасное заболевание человека, вызываемое новым коронавирусом. В декабре 2012 г. ВОЗ опубликовала временные руководящие документы по диагностике этого вируса. ВОЗ рекомендует использовать два способа диагностики этого заболевания – двухэтапную обратнo-транскриптазную ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) и иммуноферментный анализ. Первый этап ПЦР-диагностики должен включать ОТ-ПЦР-РВ с мишенью на фрагмент генома выше *upE* гена. Второй (подтверждающий) ПЦР-тест может быть направлен на альтернативные мишени в пределах вирусного генома, не перекрывающиеся с *upE* геном, и последующее секвенирование, по крайней мере, сегмента одного из вирусных генов и сравнение полученной последовательности с таковыми, депонированными в GenBank. Метод ИФА применяется ретроспективно с целью определения наличия вирусоспецифических антител в сыворотках крови реконвалесцентов.

В статье рассмотрены основные характеристики данных методов выявления возбудителя заболевания или специфических антител к нему, и методические рекомендации ВОЗ при диагностике Ближневосточного респираторного синдрома.

Ключевые слова: коронавирус, Ближневосточный респираторный синдром, респираторные инфекции, обратная транскрипция, полимеразная цепная реакция, иммуноферментный анализ, секвенирование генома, филогенетический анализ.

L.F.Stovba, V.N.Lebedev, A.A.Petrov, V.S.Kulish, S.V.Borisevich

Diagnosics of Human Middle-East Respiratory Syndrome

The 48th Central Research Institute of the Ministry of Defense, Sergiev Possad, Russian Federation

Middle-East respiratory syndrome is a human disease caused by a new coronavirus. In December, 2012 WHO published draft regulatory document on diagnostics of the virus. It was recommended to use two methods of disease diagnostics – two-phase reverse-transcription real-time PCR and enzyme immunoassay. The first phase of the PCR-diagnostics should include reverse-transcription real-time PCR targeted on the genome fragment upwards of *upE*. The second (control) PCR-test may be alternatively targeted within the bonds of the genome, its target being non-crisscross with *upE* gene. It should include sequencing of, at least, a segment of one of the viral genomes and comparative analysis of the obtained sequence along with the like ones deposited in the GenBank. Enzyme immunoassay is retrospectively used for virus-specific antibody detection in convalescents' blood sera.

Examined are the key specifications of the methods for the detection of ethiological agent or specific antibodies to it, and WHO methodological recommendations in case of Middle-East respiratory syndrome diagnostics.

Key words: coronavirus, Middle-East respiratory syndrome, respiratory infections, reverse transcription, polymerase chain reaction, enzyme immunoassay, genome sequencing, phylogenetic analysis.

Ближневосточный респираторный синдром человека (БВРС) – новое инфекционное заболевание, вызываемое коронавирусом, сопровождающееся симптомами острого поражения нижнего отдела респираторного тракта, прогрессирующей пневмонией и нередко почечной недостаточностью. Инкубационный период заболевания составляет около 5 сут [9, 15].

К настоящему времени (по состоянию на 7 февраля 2014 г.) инфекция стала причиной 182 лабораторно подтвержденных случаев в 12 странах, в том числе в 5 странах европейского региона: Германии, Италии, Великобритании, Испании и Франции. Из этих случаев 79 закончились смертельным исходом (летальность составила 43,4 %) [18].

Проведенный ретроспективный эпидемиологический анализ случаев ближневосточного респираторного синдрома (БВРС) позволил установить, что заболевание носит природно-очаговый характер, эндемичный район которого находится на Аравийском

полуострове [1]. Естественным резервуаром возбудителя в природе являются, скорее всего, насекомоядные летучие мыши, относящиеся к родам *Tylonycteris* и *Pipistrellus* [11, 15]. Групповые случаи заболевания в семьях из Саудовской Аравии, Великобритании и случаи заболевания среди обслуживающего персонала в госпитале в Саудовской Аравии и Иордании позволяют предположить возможность наиболее вероятного пути передачи возбудителя от человека к человеку – респираторного. Однако устойчивой трансмиссии возбудителя не отмечено [9].

Опасность ближневосточного респираторного синдрома усугубляется тем, что в эндемичный для возбудителя заболевания регион ежегодно приезжают миллионы туристов и паломников мусульман практически со всего мира, в том числе и из России. В настоящее время отсутствуют средства специфической профилактики и лечения, хотя, подобно ТОРС, он чувствителен к применению интерферонов I и III

типов [10]. Важно отметить, что выявлять РНК нового коронавируса могут только в лабораториях 23 из 46 стран Европейского региона [13]. Изложенные факторы определяют угрозу возникновения пандемии нового особо опасного респираторного заболевания.

В июне 2012 г. от пациента, 60-летнего гражданина Саудовской Аравии, который позже скончался, был выделен возбудитель этой инфекции, геном которого полностью секвенировали [3, 19]. Геном содержит 30119 нуклеотидов, из которых формируется 10 открытых рамок трансляции. Были выявлены вариации в позиции 11623 (U или G), предполагая, что это может быть либо валин (кодон GUC), либо глицин (кодон GGC). Валиновый кодон может быть избыточным в этой позиции у возбудителя БВРС, хотя он присутствует в большинстве других бетакоронавирусов. В позиции 27162 могут быть либо G, либо A. Эта замена G на A вводит преждевременный stop кодон (UGG на UAG). У данного вируса 5' и 3' части гена N (нуклеопротеин) белка усечены по сравнению с другими бетакоронавирусами. Основные различия в геноме коронавируса, представляющих одну и ту же монотипичную линию, наблюдаются в пределах открытой рамки трансляции (о.р.т.), расположенной около 3'-конца генома РНК. В целом же геном нового коронавируса очень напоминает геномы остальных коронавируса, особенно HCoV-NKU4 и HCoV-NKU5. Генетическое разнообразие коронавируса обеспечивается высокой частотой рекомбинации РНК и способностью больших геномов получать и терять домены [6, 12, 16]. Несмотря на выявленные отличия в геноме этого вируса, нет доказательств, что именно они определяют его высокую вирулентность.

Эксперты ВОЗ на своем заседании от 28 ноября 2012 г. утвердили в качестве обязательных требований использование для диагностики возбудителя БВРС двух методов, из которых ПЦР является обязательным [15].

В качестве первого этапа выявления РНК возбудителя в настоящее время рекомендована постановка обратной транскриптазной ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) с праймерами, фланкирующими участок генома выше E гена [4]. Для подтверждения первичных результатов рекомендуется вторая ОТ-ПЦР-РВ для альтернативной мишени в пределах вирусного генома, а также секвенирование, по крайней мере, одного из вирусных генов и дальнейшего сравнения этой последовательности с последовательностями нового коронавируса (MERS-CoV), депонированными в GenBank.

Эти требования основываются на работе V.M.Corman и соавт. [5], в которой изложены результаты двух ОТ-ПЦР-РВ. Первая реакция в качестве мишени использовала область выше E гена (upE исследование). Для подтверждения этого результата использовалась вторая ОТ-ПЦР-РВ с праймерами на открытую рамку трансляции 1в (о.р.т. 1в исследование). Последовательности праймеров и зонда указаны

в табл. 1. Последовательности этих праймеров не перекрывались с таковыми, использованными ранее для выявления РНК других коронавирусов. При этом условия проведения обоих ОТ-ПЦР-РВ были одинаковы [7, 8, 17].

Для определения чувствительности использовались разведения вируса от 0,01 до 0,1 ЦПД₅₀ на реакцию. Более детальная оценка чувствительности проводилась с точными количествами *in vitro* транскрибированной РНК, представляющей собой полученные авторами ПЦР-фрагменты, перекрывающие области ампликонов из обоих опытов [5].

В результате исследований установлено, что чувствительность в upE исследовании составляет 3,4 копии РНК на реакцию (95 % доверительный интервал) или 291 копия на мл пробы, а в о.р.т. 1в – значительно ниже (64 копии РНК на реакцию при 95 % доверительном интервале).

Определение специфичности выполнялось с использованием культур таких известных респираторных вирусов как вирусы парагриппа типов 1–4, респираторно-синцитиального вируса, человеческого метапневмовируса, человеческих парехавирусов 1 и 3 типов, вируса гриппа А (H1N1, H3N2), вируса гриппа В, риновируса, энтеровируса, аденовируса и коронавируса: HCoV-NL63, HCoV-OC43, HCoV229E, HCoV-NKU1. Ни в одной из ОТ-ПЦР-РВ положительных результатов не зафиксировано, при этом коронавирус HCoV229E использовался в количестве $3 \cdot 10^9$ РНК копий/мл, HCoV-NL63 – $4 \cdot 10^{10}$, HCoV-OC43 – $3 \cdot 10^{10}$, SARS-CoV – $5 \cdot 10^{10}$. В общем, ни в одной из 92 клинических проб, содержащих респираторные вирусы, не зарегистрировано накопления специфического ампликона, в отличие от положительных контролей. Авторами сделано заключение, что эти результаты могут быть свободно применимы для исследования клинических проб. В обоих опытах получены специфические продукты амплификации, причем upE исследования более чувствительны, чем о.р.т. 1в. Следовательно, авторы этого сообщения считают [5], что, если в клинической лаборатории будут получены положительные результаты в upE исследовании, то для их подтверждения можно использовать о.р.т. 1в исследование, причем авторы обеспечат *in vitro* транскрибированными РНК в качестве положительных контролей upE исследования.

В дальнейшем, учитывая, что первым шагом диагностики должно быть upE исследование, а вторым – ОТ-ПЦР-РВ с праймерами на другой, не перекрывающийся с E геном фрагмент, эта же группа авторов предложила в качестве мишени для второй подтверждающей реакции использовать о.р.т. 1а [4], что, возможно, было обусловлено низкой чувствительностью о.р.т. 1в подтверждающей реакции. Используемые при постановке ОТ-ПЦР-РВ последовательности праймеров и зондов представлены в табл. 1.

Результаты исследования о.р.т. 1а установили, что чувствительность этой реакции составляла 4,1

Специфические компоненты и условия постановки ОТ-ПЦР-РВ для выявления РНК БВРС

Ген-мишень	Компоненты реакции		Условия постановки реакции
	Компонент	Структура компонента	
Область генома выше гена белка E (upE)	Прямой праймер	GCAACGCGCGATTCAGTT	
	Обратный праймер	GCCTCTACACGGGACCCATA	
	Зонд	(6-карбоксихлорофлуоресцеин-[FAM])-CTCTTCACATGATCGCCCCGAGCTCG-6-карбоксо-N,N,N,N-тетраметилродамиин [TAMRA])	
O.P.T. 1в	Прямой праймер	TTCGATGTTGAGGGTGCTCAT	55 °C – 20 мин 95 °C – 3 мин 95 °C – 15 с 58 °C – 30 с } 45 циклов
	Обратный праймер	TCACACCAGTTGAAAATCCTAATTG	
	Зонд	(6-карбоксихлорофлуоресцеин-[FAM])-CCCGTAATGCATGTGGCACCAATGT-6-карбоксо N,N,N,N-тетраметилродамиин [TAMRA])	
O.P.T. 1а	Прямой праймер	CCACTACTCCCAATTCGTCAG	
	Обратный праймер	CAGTATGTGTAGTGCGCFFTAAGCA	
	Зонд	(6-карбоксихлорофлуоресцеин-(FAM)-TTGCAAATGGCTTGCCCCCACT-6-карбоксо-N,N,N,N-тетраметилродамиин (TAMRA))	

РНК копии на реакционную пробу, т.е. равнялась таковой для upE исследования. Для подтверждения более высокой чувствительности о.р.т. 1а исследования были поставлены параллельные реакции с бронхоальвеолярными пробами от больного, находившегося в Эссен (Германия). Эти пробы имели очень низкую концентрацию РНК – около 360 копий/мл, что определено в upE исследовании. В о.р.т. 1а исследовании так же были получены положительные результаты, а в о.р.т. 1в – нет. Факт более высокой чувствительности о.р.т. 1а исследования особенно важен при диагностике клинических проб с небольшим количеством вируса, т.е. на очень ранней или очень поздней стадии заболевания.

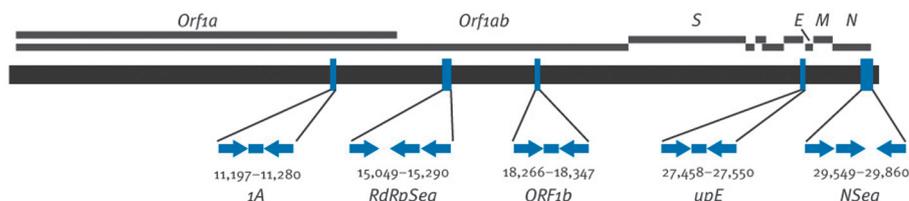
Специфичность реакции оценивалась на 42 клинических пробах параллельно с пробами, содержащими другие коронавирусы: HCoV-OC43 (1·10⁸ РНК копии/мл), HCoV-229E (3·10⁹), HCoV-NL63 (4·10⁹) и ТОРС (5·10¹⁰), а также человеческий риновирус, энтеровирус, вирус ЕСНО, человеческий метапневмовирус, респираторно-синцитиальный вирус, вирус парагриппа 1–4 типов, вирус гриппа 1 и 2 типов, аденовирус. Положительные результаты получены только для MERS-CoV.

Учитывая требования ВОЗ, что помимо постановки двух ОТ-ПЦР-РВ, необходимо секвенировать хотя бы один ген нового коронавируса и сравнить его последовательность с таковой, депонированной в

GenBank, были секвенированы два ампликона, полученные в ОТ-ПЦР. Один из них – это RdRp ген (РНК-зависимая РНК-полимераза), наиболее консервативный ген в геноме HCoV (рисунок) бетакоронавируса линии С – вируса летучих мышей. Однако праймеры для него находятся в высококонсервативной области и перекрестно реагируют с другими коронавирусами, такими как HCoV-OC43, HCoV-NKU1, HCoV-NL63, HCoV-229E и ТОРС. Последовательность этого гена (RdRpSeq) также используется для типирования коронавирусов [2, 17].

Второй ампликон – высокоспецифический фрагмент в пределах N нуклеокапсидного гена (NSeq), выбранный из-за наличия в нем 6 нуклеотидной делеции, которая определена в пробах от пациентов в Лондоне и Эссексе. Хотя еще рано делать какие-то выводы о вирусном разнообразии, связанным с этим отличием. В дальнейшем будет интересно секвенировать и сравнить NSeq фрагмент большого числа вирусов с целью классификации штаммов.

Ампликоны для секвенирования RdRp и N генов получены в ОТ-ПЦР с помощью специфических праймеров. В табл. 2 представлены последовательности праймеров и условия ОТ-ПЦР для амплификации RdRpSeq и NSeq фрагментов. Используемые реактивы те же, что и в предыдущих реакциях. Если в первом раунде реакций не наблюдалось видимых ампликонов, то ставили второй раунд (полугнездо-



Гены-мишени для диагностики нового человеческого коронавируса (MERS-CoV):

Праймеры представлены стрелками. Получаемые ампликоны – линии между праймерами. Цифры ниже ампликонов указывают их позиции на геноме MERS-CoV. RdRpSeq – ампликон, полученный полугнездовой ОТ-ПЦР и используемый для секвенирования (мишень RdRp ген). NSeq – ампликон для секвенирования, полученный тем же методом (мишень N ген) в работе [5, 6]. S – ген, кодирующий вирусные шипики, E – ген белка оболочки, M – ген мембранного белка, N – ген нуклеокапсидного белка, Orf – открытая рамка трансляции, RdRp – РНК-зависимая РНК-полимераза [19]

Специфические компоненты ОТ-ПЦР для получения RdRpSeq и NSeq ампликонов [4]

Ген-мишень для секвенирования	Компоненты реакции		Условия постановки реакции
	Компонент	Структура компонента	
RdRpSeq	Прямой праймер	TGCTATWAGTGCTAA GAATAGRGC R=A/G, W=A/T	50 °C – 20 мин 95 °C – 3 мин 95 °C – 15 с 56 °C – 15 с 72 °C – 30 с } 45 циклов
	Обратный праймер	GCAIWGCNCWGTCAAC ACTTAGG W=A/T, N=A/C/T/G	
	Обратный праймер для второго раунда	CACTTAGGRTARTCC CAWCCCA	
NSeq	Прямой праймер	CCTTCGGTACAGTGG AGCCA	То же, что и в первом раунде для RdRpSeq
	Обратный праймер	GATGGGGTTGCCAAA CACAAAAC	
	Прямой праймер для второго раунда	TGACCCAAAGAATCC CAATCCCAACTAC	То же, что и во втором раунде для RdRpSeq

вая ПЦР). Последовательность прямого праймера для RdRpSeq фрагмента во втором раунде та же, что и в первом. Последовательность обратного праймера для NSeq фрагмента во второй реакции та же, что и в первой [4].

Результаты секвенирования генов, амплифицированных с праймерами, представленными в табл. 2, подтверждают принадлежность возбудителя БВРС к бетакоронавирусам линии С.

Согласно рекомендациям ВОЗ при диагностике этого вируса необходимо придерживаться двух различных методов. При диагностике опасных и особо опасных заболеваний человека чаще всего используют ПЦР в различных модификациях и ИФА. Последний метод (выявление специфических антител возбудителя) получил наибольшее распространение из иммунохимических методов. С помощью ИФА возможна идентификация вируса, однако по чувствительности он уступает ПЦР. Кроме того, высока вероятность ложноположительных результатов из-за перекрестной реактивности с четырьмя другими патогенными для человека коронавирусами [15]. Поэтому ИФА применяется, в основном, для серологической диагностики, причем антитела к возбудителю БВРС определяются, когда вирус еще есть в организме человека, и наблюдаются симптомы болезни [4]. Этот метод незаменим для определения иммунного статуса на поздней стадии заболевания, когда вирус уже элиминировался из организма, и постановка диагноза перенесенного заболевания возможна только по наличию вирусоспецифических антител.

Таким образом, методы диагностики новой коронавирусной инфекции – БВРС, позволяют выявлять его геномную РНК на всех стадиях инфекции. Согласно рекомендациям ВОЗ, на первом этапе в обязательном порядке применяется ОТ-ПЦР-РВ с праймерами, рассчитанными только для данного вируса, на область генома выше Е гена. Для подтверждения этого результата применяется вторая ОТ-ПЦР-РВ с праймерами на о.р.т. 1а. Эти две реакции опреде-

ляют видовую принадлежность возбудителя БВРС. Обе реакции специфичны и высокочувствительны. Для подтверждения принадлежности БВРС к бетакоронавирусам линии С летучих мышей необходимо секвенировать хотя бы один из консервативных генов и сравнить его последовательность с таковой, депонированной в GenBank. Метод ИФА применяется ретроспективно с целью определения наличия вирусоспецифических антител у реконвалесцентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Стовба Л.Ф., Лебедев В.Н., Петров А.А., Кулиш В.С., Борисевич С.В. Ближневосточный респираторный синдром – заболевание человека, вызываемое новым коронавирусом. *Воен.-мед. журн.* 2013; 11:76–7.
2. Bermingham A., Heinen P., Iturriza-Gomara M., Gray J., Appleton H., Zambon M.C. Laboratory diagnosis of SARS. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2004; 359(1447):83–9.
3. Boheemen S., Graaf M., Lauber C., Bestebroer T.M., Raj V.S., Zaki A.M., Osterhaus A.D.M.E., Haagmans B.L., Gorbalenea A.E., Snijder E.J., Fouchier R.A.M. Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *MBio.* 2012, 3(6):pii:e00473-12. (cited 20 Nov 2012). doi:10.1128/mBio.00473-12. Available from: <http://mbio.asm.org/content/3/6/e00473-12.full>.
4. 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., Ditter U., Bonin F., Wolff T. Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections. *Euro Surveill.* 2012; 17(49):pii=20334. (cited 06 Dec 2012). Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20334>.
5. Corman V.M., Eckerle I., Bleicker T., Zaki A., Landt O., Eschbach-Bludau M., Boheemen S., Goral R., Ballhouse M., Bestebroer T.M., Muth D., Muller M.A., Drexler J.F., Zambon M., Osterhaus A.D., Fouchier R.M. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Euro Surveill.* 2012; 17(39):pii=20285. (cited 27 Sep 2012). Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20285>.
6. de Groot R.J., Baker S.C., Baric R., Enjuanes L., Gorbalenya A.E., Holmes K.V., Brown C.S., Drosten C., Fouchier R.A., Galiano M. Family *Coronaviridae*. In: *Virus Taxonomy*, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses; King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. (Eds.). Elsevier Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 2012. P. 806–28.
7. de Souza Luna L.K., Heiser V., Regamey N., Panning M., Drexler J.F., Mulangu S., Sims A.C., Tilton S.C., Menachery V.D., Gralinski L.E., Schafer A., Matzke M.M., Webb-Robertson B.J., Chang J. Generic detection of coronaviruses and differentiation at the prototype strain level by reverse transcription-PCR and nonfluorescent low-density microarray. *J. Clin. Microbiol.* 2007;

45(3):1049–52.

8. Emery S.L., Erdman D.D., Bowen M.D., Newton B.R., Winchell J.M., Meyer R.F., Urbani C., Comer J.A., Lim W., Rollin P.E., Dowell S.F. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for SARS-associated coronavirus. *Emerg. Infect. Dis.* 2004; 10(2):311–16.

9. Khan G. A novel coronavirus capable of lethal human infections: an emerging picture. *Virology Journal.* 2013; 10:66. (cited 28 Feb 2013). doi:10.1186/1743-422X-10-66. Available from: <http://www.virologyj.com/content/10/1/66>.

10. Kindler E., Jonsdottir H.R., Muth D., Hamming O.J., Hartmann R., Rodriguez R., Geffers R., Fouchier R.A., Drosten C., Müller M.A., Dijkman R., Thiel R. Efficient replication of the novel human betacoronavirus EMC on primary human epithelium highlights its zoonotic potential. *MBio.* 2013; 4(1):e00611-12. (cited 19 Feb 2013). doi:10.1128/mbio.00611-12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3573664/>.

11. Li W., Shi Z., Yu M., Ren W., Smith C., Epstein J.H. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science.* 2005; 310:676–9. (cited 29 Sep 2005). doi:10.1126/science.1118391. Available from: <http://www.sciencemag.org/content/310/5748/676>.

12. Masters P.S. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 2006; 66:193–292.

13. Palm D., Pereyaslov D., Vaz J., Broberg E., Zeller H., Gross D., Brown C.S. Laboratory capability for molecular detection and confirmation of novel coronavirus in Europe. *Euro Surveill.* 2012; 17(17):pii=20335. (cited 5 Dec 2012). Available from: <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V17N49/art20335.pdf>

14. Pollak M.P., Pringle C., Madoff L.S., Memish Z.A. Novel coronavirus – Middle East. *J. Infect. Dis.* 2013; 17(2):e143-4. (cited 27 Dec 2012). doi: 10.1016/j.jid.2012.12.001. Available from: <http://www.ijidonline.com/article/S1201-9712%2812%2901310-0/fulltext>

15. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Rapid risk assessment. Severe respiratory disease associated with a novel coronavirus. Stockholm: ECDC; 19 February 2013. (cited 22 Feb 2014). Available from: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/novel-coronavirus-rapid-risk-assessment-update.pdf>.

16. Snijder E.J., Bredenbeek P.J., Dobbe J.C., Thiel V., Ziebuhr J., Poon L.L., Guan Y., Rozanov M., Spaan W.J., Gorbalenya A.E. Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J. Mol. Biol.* 2003; 331:991–1004.

17. Vijgen L., Moës E., Keyaerts E., Li S., Van Ranst M. A pan-coronavirus RT-PCR assay for detection of all known coronaviruses. *Methods Mol. Biol.* 2008; 454:3–12.

18. WHO. Global Alert and Response (GAR): Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) – update. 07 Feb 2014 (cited 07 Feb 2014). Available from: http://www.who.int/csr/don/2014_02_07mers/en/index.html.

19. 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. *N. Engl. J. Med.* 2012; 367:1814–20.

References

1. Stovba L.F., Lebedev V.N., Petrov A.A., Kulish V.S., Borisevich S.V. [Middle-East respiratory syndrome – human diseases caused by a new coronavirus]. *Voen. Med. Zh.* 2013; 11:76–7.

2. Bermingham A., Heinen P., Iturriza-Gomara M., Gray J., Appleton H., Zambon M.C. Laboratory diagnosis of SARS. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2004; 359(1447):83–9.

3. Boheemen S., Graaf M., Lauber C., Bestebroer T.M., Raj V.S., Zaki A.M., Osterhaus A.D.M.E., Haagmans B.L., Gorbalenya A.E., Snijder E.J., Fouchier R.A.M. Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *MBio.* 2012, 3(6):pii=e00473-12. (cited 20 Nov 2012). doi:10.1128/mbio.00473-12. Available from: <http://mbio.asm.org/content/3/6/e00473-12.full>.

4. 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., Ditter U., Bonin F., Wolff T. Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections. *Euro Surveill.* 2012; 17(49):pii=20334. (cited 06 Dec 2012). Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20334>.

5. Corman V.M., Eckerle I., Bleicker T., Zaki A., Landt O., Eschbach-Bludau M., Boheemen S., Goral R., Ballhause M., Bestebroer T.M., Muth D., Müller M.A., Drexler J.F., Zambon M., Osterhaus A.D., Fouchier R.M. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Euro Surveill.* 2012; 17(39):pii=20285. (cited 27 Sep 2012). Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20285>.

6. de Groot R.J., Baker S.C., Baric R., Enjuanes L., Gorbalenya A.E., Holmes K.V., Brown C.S., Drosten C., Fouchier R.A., Galiano M. Family *Coronaviridae*. In: *Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*; King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. (Eds.). Elsevier Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 2012. P. 806–28.

7. de Souza Luna L.K., Heiser V., Regamey N., Panning M., Drexler J.F., Mulangu S., Sims A.C., Tilton S.C., Menachery V.D., Gralinski L.E., Schafer A., Matzke M.M., Webb-Robertson B.J., Chang J. Generic detection of coronaviruses and differentiation at the prototype strain level by reverse transcription-PCR and nonfluorescent low-density microarray. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45(3):1049–52.

8. Emery S.L., Erdman D.D., Bowen M.D., Newton B.R., Winchell J.M., Meyer R.F., Urbani C., Comer J.A., Lim W., Rollin P.E., Dowell S.F. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for SARS-associated coronavirus. *Emerg. Infect. Dis.* 2004; 10(2):311–16.

9. Khan G. A novel coronavirus capable of lethal human infections: an emerging picture. *Virology Journal.* 2013; 10:66. (cited 28 Feb 2013). doi:10.1186/1743-422X-10-66. Available from: <http://www.virologyj.com/content/10/1/66>.

10. Kindler E., Jonsdottir H.R., Muth D., Hamming O.J., Hartmann R., Rodriguez R., Geffers R., Fouchier R.A., Drosten C., Müller M.A., Dijkman R., Thiel R. Efficient replication of the novel human betacoronavirus EMC on primary human epithelium highlights its zoonotic potential. *MBio.* 2013; 4(1):e00611-12. (cited 19 Feb 2013). doi:10.1128/mbio.00611-12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3573664/>.

11. Li W., Shi Z., Yu M., Ren W., Smith C., Epstein J.H. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science.* 2005; 310:676–9. (cited 29 Sep 2005). doi:10.1126/science.1118391. Available from: <http://www.sciencemag.org/content/310/5748/676>.

12. Masters P.S. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 2006; 66:193–292.

13. Palm D., Pereyaslov D., Vaz J., Broberg E., Zeller H., Gross D., Brown C.S. Laboratory capability for molecular detection and confirmation of novel coronavirus in Europe. *Euro Surveill.* 2012; 17(17):pii=20335. (cited 5 Dec 2012). Available from: <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V17N49/art20335.pdf>

14. Pollak M.P., Pringle C., Madoff L.S., Memish Z.A. Novel coronavirus – Middle East. *J. Infect. Dis.* 2013; 17(2):e143-4. (cited 27 Dec 2012). doi: 10.1016/j.jid.2012.12.001. Available from: <http://www.ijidonline.com/article/S1201-9712%2812%2901310-0/fulltext>

15. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Rapid risk assessment. Severe respiratory disease associated with a novel coronavirus. Stockholm: ECDC; 19 February 2013. (cited 22 Feb 2014). Available from: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/novel-coronavirus-rapid-risk-assessment-update.pdf>.

16. Snijder E.J., Bredenbeek P.J., Dobbe J.C., Thiel V., Ziebuhr J., Poon L.L., Guan Y., Rozanov M., Spaan W.J., Gorbalenya A.E. Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J. Mol. Biol.* 2003; 331:991–1004.

17. Vijgen L., Moës E., Keyaerts E., Li S., Van Ranst M. A pan-coronavirus RT-PCR assay for detection of all known coronaviruses. *Methods Mol. Biol.* 2008; 454:3–12.

18. WHO. Global Alert and Response (GAR): Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) – update. 07 Feb 2014 (cited 07 Feb 2014). Available from: http://www.who.int/csr/don/2014_02_07mers/en/index.html.

19. 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. *N. Engl. J. Med.* 2012; 367:1814–20.

Authors:

Stovba L.F., Lebedev V.N., Petrov A.A., Kulish V.S., Borisevich S.V. The 48th Central Research Institute of the Ministry of Defense, Sergiev Possad, Russian Federation.

Об авторах:

Стовба Л.Ф., Лебедев В.Н., Петров А.А., Кулиш В.С., Борисевич С.В. 48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации. Российская Федерация, Сергиев Посад.

Поступила 16.01.14.