

Идентификация таксономической принадлежности вирусов с помощью таргетного анализа вирусного генома

Чалей М.Б.¹, Кутыркин В.А.²

¹*ИМПБ РАН – филиал ИПМ им. М.В. Келдыша РАН, Пущино, Россия*

²*МГТУ им. Н.Э. Баумана, Москва, Россия*

maramaria@yandex.ru

Настоящая работа посвящена проблеме распознавания таксономической принадлежности вирусных геномов. Возможность такого распознавания по отдельным фрагментам вирусных геномов показана на примерах идентификации вида флавивирусов и рода коронавирусов. В качестве таких фрагментов использовались гены, кодирующие как неструктурные, так и структурные белки вирусов. При анализе таксономической принадлежности генома вируса наряду с отдельными генами использовались их различные объединения. Все вместе они были названы таргетами, поскольку с их помощью проводился целевой сокращенный анализ генома. В данной работе было выделено шесть таргетов. Результаты распознавания по каждому таргету совместно образовывали вариантную строку. Окончательный вывод о таксономической принадлежности делался на основе анализа вариантной строки, когда не менее четырех компонент строки указывали на один и тот же род коронавируса. Такой подход выявил заметную мозаичность вариантных строк при распознавании рода коронавирусов. Наиболее значимо мозаичность проявилась при распознавании на основе отдельных генов: S-гена спайк белка и N-гена белка нуклеокапсида, что может быть обусловлено гомологичной рекомбинацией в геномах коронавирусов. Предложенный таргетный анализ может быть использован для быстрой и надежной таксономической идентификации вирусов в метагеномных исследованиях.

Ключевые слова: геном коронавируса, род коронавируса, таксономическая идентификация вирусов, таргетный анализ вирусного генома, вариантный подход.

Identification of Virus Taxonomic Position with The Help of Targeted Analysis of Viral Genome

Chaley M.B.¹, Kutyrkin V.A.²

¹*Institute of Mathematical Problems of Biology RAS – branch of KIAM RAS Pushchino, Russia*

²*Moscow State Technical University n.a. N.E. Bauman, Moscow, Russia*

The present work is devoted to a problem of recognizing taxon for viral genomes. Possibility of such a recognition based on distinct key fragments of viral genomes is shown in the examples of identifying the flavivirus species and coronavirus genera. The genes encoding both non-structural and structural proteins were used as such the fragments. Different combinations of selected genes along with the genes were considered to investigate taxonomic position of virus genome. All together they were named targets, so targeted and shortcut analysis of virus genome was conducted with their help. Six targets were chosen in the present work. A number of results of coronavirus genus recognition over all targets formed a variant string in targeted analysis of viral genome. Finally, the genome analyzed was attributed to taxonomic position, when at least four components of the string pointed at the same genus of coronavirus. Such the approach revealed noticeable mosaicism of the variant strings in recognizing genus of the coronaviruses. The more significantly mosaicism was observed in recognition on the base of spike protein S-gene and N-gene of nucleocapsid protein, that is probably due to homological recombinations between the genomes of coronaviruses of different genera. Targeted analysis and variant approach proposed in the work may be used for fast and reliable taxonomic identification of the viruses in metagenomic research.

Key words: coronavirus genome, coronavirus genus, virus taxonomic identification, targeted analysis of viral genome, variant approach.

1. Введение

Все живые организмы на Земле поражаются вирусами. Их средой обитания являются бактерии, водоросли, растения, простейшие, беспозвоночные и позвоночные [1]. Потенциал патогенности вирусов по-прежнему остается малоизученным, несмотря на огромную работу ученых биологов и вирусологов, продолжающуюся с начала прошлого века. Во всей своей истории существования человеческое общество постоянно сталкивалось и продолжает сталкиваться с инфекционными болезнями, большинство из которых происходит из популяций домашних и диких животных [1–3]. Новые и вновь возвращающиеся (emerging-reemerging) вирусные инфекции, возникающие в результате естественных природных изменений и катаклизмов, и также человеческого вмешательства, представляют особую опасность [3–5]. Как показала пандемия COVID-19, они способны вызывать чрезвычайные эпидемические ситуации, борьба с которыми на этапе их возникновения трудна [6, 7]. Принципиально важным остаётся вопрос о механизмах преодоления межвидового барьера. Процесс передачи (выброса) вируса из популяции основного хозяина к другим видам животных и человеку интенсивно изучается на молекулярно-генетическом уровне [8]. Секвенирование полных геномов изолятов вируса SARS-CoV-2, вызвавшего пандемию, предлагается как наилучший способ генетического анализа по распространению новых патогенных штаммов этого вируса [9]. Тем не менее для отслеживания мутантных штаммов SARS-CoV-2 и других видов коронавирусов можно применить более быстрый и экономичный подход таргетного секвенирования [10]. Например, при таргетном подходе можно секвенировать только один наиболее переменный фрагмент гена шиповидного S-белка, ответственного за связывание с клеточными рецепторами при инфицировании. Проводя некоторую смысловую аналогию, таргетный подход к генетическому анализу можно предложить и для быстрой идентификации вида вируса или рода по каким-то отдельно выделенным фрагментам вирусного генома.

1.1. Идентификация генома вируса методом выравнивания с геномами известных вирусов

Обычно поиск наибольшего сходства классифицируемого вирусного генома с другими известными геномами вирусов из базы GenBank [11] выполняется с помощью выравнивания последовательностей их полных геномов. Так в случае возникающих затруднений в определении вида или подтипа флавивируса (*Flaviviridae*) с помощью иммуноферментного анализа, рекомендуется [12] применение метода обратной транскрипции с последующим секвенированием cDNA генома вируса и его сканирование по базе GenBank для поиска подобия с геномами известных

вирусов путем выравнивания их последовательностей. Именно в результате выравнивания полных геномов коронавирусов из базы GenBank геном вируса SARS-CoV-2 показал в среднем 96 % идентичности со штаммом коронавируса RaTG13 среднего подковоноса (*Rhinolophus affinis*), обнаруженного в провинции Юньнань (КНР) в 2013 г. [13], что позволило установить происхождение вируса, вызвавшего пандемию COVID-19.

В работах [14, 15] по распознаванию вида и рода РНК-содержащих вирусов, геном которых представлен одноцепочечной РНК положительной полярности (из семейств *Flaviviridae* и *Coronaviridae*) была показана возможность надежной идентификации таксономической принадлежности вируса с помощью обобщенного вектора частот кодонов в генах вирусных белков. Такой метод гораздо менее трудоемок, чем обычно используемый для этих целей метод выравнивания геномов.

1.2. Таргетный анализ и вариантный подход к идентификации вирусов

Флавивирусы, вызывающие тяжелые инфекционные заболевания, среди которых желтая лихорадка, лихорадка денге, различные энцефалиты и др., распространяются комарами и клещами и имеют свои зоонозные источники [16, 17]. Основным природным очагом коронавирусных инфекций признаны летучие мыши [18, 19]. В свете сегодняшних и возможных будущих эпидемических вызовов, предлагается создание системы мониторинга генофондов вирусных популяций в различных экосистемах с использованием современных методов анализа вирусных геномов на национальном и международном уровнях [20].

Настоящая работа на примере создания метода надежно идентифицирующего род коронавирусов подсемейства *Orthocoronavirinae* на основе обобщенного распределения частот кодонов в отдельных генах вирусного генома демонстрирует возможность выделения генов, однозначно определяющих его таксономическое положение. С этой целью можно использовать не только отдельные гены, но и их различные объединения. Все вместе они рассматриваются как варианты-мишени или таргеты (target – цель, мишень) для надежного определения рода коронавируса. Понимается, подобные таргеты могут быть выделены в геномах вирусов любых семейств, родов и видов с целью их быстрой идентификации.

При разработке вариантного метода [15] мы опирались на опыт предыдущей работы по эффективному распознаванию вида флавивируса на основе распределения частот кодонов в кодирующей части генома, транскрибируемой единым полипротеином [14]. По аналогии с геном полипротеина флавивируса можно рассмотреть псевдо-ген, составленный из отдельных генов структурных белков коронавируса. В качестве таких

генов в работе были выбраны ген полипротеина pp1ab – ORF1ab, кодирующий 16 неструктурных белков, и три гена структурных белков: S-ген, M-ген и N-ген. Совместное распределение частот кодонов этих генов, учитывающее длину каждого в псевдогене, использовалось в первом варианте распознавания рода коронавируса. Для этого первого варианта V_1 использовалось обозначение S+N+M+ORF1ab. Поскольку каждый из генов, входящих в вариант V_1 , имеет свою степень пластичности и консервативности, для распознавания рода коронавируса дополнительно были исследованы еще пять других вариантов сочетания этих генов: V_2) S+N+M, V_3) S+N, V_4) ORF1ab, V_5) S и V_6) N.

Коронавирусы подсемейства *Orthocoronavirinae* подразделяются на четыре рода. Летучие мыши являются природным резервуаром для родов *Alphacoronavirus* (α -CoV) и *Betacoronavirus* (β -CoV), птицы – для родов *Deltacoronavirus* (δ -CoV) и *Gammacoronavirus* (γ -CoV) [18]. Результат распознавания коронавируса в вариантном подходе представляется в виде вариантной строки $\nu = (v_1, v_2, v_3, v_4, v_5, v_6)$, где v_i – результат распознавания рода коронавируса с помощью варианта V_i для $i = 1, 6$, т.е. $v_i \in \{\alpha, \beta, \delta, \gamma\}$ -CoV.

Однозначный результат вариантного подхода для анализируемого генома коронавируса определяется в случае четырех одинаковых компонент в вариантной строке. Такой подход позволяет сравнить надежность всех рассматриваемых вариантов распознавания и степень консервативности рассматриваемых генов. Мозаичность вариантной строки, т.е. наличие в ней неодинаковых компонент, может иметь различное биологическое объяснение, в частности, как результат гомологичной рекомбинации между генами коронавирусов различных видов [21].

2. Материалы и методы

2.1. Анализируемые геномы и таргетные гены коронавируса

Для создания усредненного распределения кодонов в каждом роде коронавирусов использовались соответствующие гены прототипных штаммов рода, GenBank коды доступа которых приведены в [22]. Для рода *Alphacoronavirus* рассматривались 22 прототипных штамма, для рода *Betacoronavirus* – 28, для родов *Deltacoronavirus* и *Gammacoronavirus* – 10 и 7 прототипных штаммов, соответственно.

Помимо геномов прототипных штаммов в работе использовались геномы коронавирусов четырех родов, полученные из базы данных нуклеотидных последовательностей GenBank. Количество всех анализируемых последовательностей геномов (вместе с прототипными штаммами) для родов α -

CoV, β -CoV, δ -CoV и γ -CoV составляло: 924, 1954, 19 и 345, соответственно.

Из всех геномов были выделены анализируемые в работе таргетные гены ORF1ab, S, M и N. В качестве обучающей выборки для распознавания рода использовались известные прототипные штаммы коронавирусов, коды доступа которых в GenBank исходно были даны в работе [22].

2.2. Статистический метод распознавания рода коронавируса

Для рода x -CoV, где $x \in \{\alpha, \beta, \delta, \gamma\}$ – символ, обозначающий род коронавируса, количественные характеристики имеют вид:

M^x – количество прототипных штаммов рода x -CoV;

n – номер прототипного штамма;

$p_Y^x(n)$ – распределение частот кодонов в CDS гена Y , где $Y \in \{\text{ORF1ab}, S, M, N\}$ – символ рассматриваемого гена.

$l_Y^x(n)$ – длина CDS гена Y в прототипе с номером n ;

$l^x(n) = \sum_{Y=1}^4 l_Y^x(n)$ – сумма длин соответствующих

генов в прототипе с номером n .

В соответствии с введенными обозначениями для усредненного взвешенного распределения P^x частот кодонов по прототипам рода x -CoV используется формула:

$$P^x = \frac{1}{M^x} \sum_{n=1}^{M^x} \sum_{Y=1}^4 \frac{l_Y^x(n)}{l^x(n)} p_Y^x(n). \quad (1)$$

Результаты численных экспериментов показали, что определение рода коронавируса существенно улучшается, если из распределений P^x частот кодонов исключить самые низкие частоты. Такими частотами оказались для всех генов частоты трех стоп-кодонов (TERM) и для ORF1ab и S генов два (cga и cgg) из шести синонимичных кодонов аргинина (ARG), а для N-гена – два кодона (tgt и tgc) цистеина (CYS). Это учитывалось при вычислении усредненных распределений частот кодонов по формуле (1). Следовательно формат усредненного распределения P^x имеет вид:

$$P^x = (P_1^x, P_2^x, \dots, P_{59}^x).$$

Если рассматривается геном коронавируса неизвестного рода, то для его распределений частот кодонов (после исключения указанных выше кодонов) в гене Y используется обозначение p_Y , где $Y \in \{\text{ORF1ab}, S, M, N\}$. Следовательно, аналогично формуле (1), взвешенное распределение P частот кодонов в геноме вычисляется согласно формуле:

$$p = \sum_{Y=1}^4 \frac{l_Y^x}{l^x} p_Y^x, \quad (2)$$

где $Y \in \{\text{ORF1ab}, S, M, N\}$. Формат распределения

p имеет вид: $p = (p_1, p_2, \dots, p_{59})$.

Используя это обозначение, отклонение $D(P^x, p)$ взвешенного распределения p частот кодонов в анализируемом геноме отдельного прототипного штамма или генома коронавируса неизвестного рода от усредненного взвешенного распределения P^x частот кодонов рода x -CoV вычисляется по формуле:

$$D(P^x, p) = \frac{1}{7} \sum_{i=1}^{59} \frac{|P_i^x - p_i|}{P_i^x} \quad (3)$$

Формулы (1)–(3) введены для случая, когда совместно рассматривают четыре гена ORF1ab, S, M и N, для чего вводится обозначение: V_1) S+N+M+ORF1ab. Аналогичные формулы также используются для вариантов объединения генов: V_2) S+N+M, V_3) S+N и для отдельных генов V_4) ORF1ab, V_5) S и V_6) N. Среди отклонений $D(P^x, p)$, где $x \in \{\alpha, \beta, \delta, \gamma\}$ выбирается минимальное, которое предлагается как результат распознавания рода анализируемого генома коронавируса с помощью выбранного варианта объединения генов.

3. Результаты и обсуждение

Таблица 1. Количественные результаты правильного распознавания рода прототипных (п/т) штаммов коронавируса с помощью различных вариантов объединения генов

Варианты объединения генов	α -CoV Всего 22 п/т штамма	β -CoV Всего 28 п/т штаммов	δ -CoV Всего 10 п/т штаммов	γ -CoV Всего 7 п/т штаммов
V_1	20	25	9	7
V_2	22	24	9	7
V_3	22	25	9	7
V_4	20	25	9	7
V_5	22	23	9	7
V_6	19	28	10	7

Из таблицы 1 следует, что надежность распознавания рода коронавируса для прототипных штаммов по всем шести вариантам, в среднем, составила 93 %.

Результаты применения статистики (3) для распознавания рода последовательностей вирусных геномов из базы GenBank, используя те же усредненные взвешенные распределения частот кодонов, полученные для прототипов каждого рода коронавируса, показаны в таблице 2. В среднем, надежность распознавания по всем шести вариантам составила 95.6 %.

Таблица 2. Количественные результаты правильного распознавания рода последовательностей геномов коронавируса (вместе с геномами рассматриваемых прототипных штаммов) из базы GenBank с помощью различных вариантов объединения генов

Варианты объединения генов	α -CoV Всего геномов: 924	β -CoV Всего геномов: 1954	δ -CoV Всего геномов: 19	γ -CoV Всего геномов: 345
V_1	911	1883	16	342
V_2	903	1887	17	342
V_3	831	1898	17	342
V_4	910	1906	16	343
V_5	898	1898	17	192
V_6	743	1924	19	343

3.1. Вариантный подход к распознаванию рода коронавируса

В вариантном подходе результат распознавания рода для последовательности вирусного генома выглядит в виде вариантной строки $v = (v_1, v_2, v_3, v_4, v_5, v_6)$, где $v_i \in \{\alpha, \beta, \delta, \gamma\}$ – есть результат распознавания рода (α -CoV, β -CoV, δ -CoV и γ -CoV) коронавируса с использованием i -го ($i = 1, 6$) варианта объединения генов.

В подавляющем большинстве случаев компоненты вариантной строки представлены одной буквой. Однако, встречаются случаи, когда в вариантной строке распознавания встречаются разные компоненты, то есть вариантный подход проявляет некоторую мозаичность в распознавании рода по геному коронавируса.

Правило распознавания рода коронавируса по анализируемой геномной последовательности можно предложить для вариантного подхода в границах таргетного анализа. Род коронавируса считается распознанным, если среди шести компонент вариантной строки на него указывают не менее четырех. Таблица 3 показывает количественный состав вариантных строк с одинаковыми компонентами, корректно указывающих род коронавируса, и соответствующих этому правилу.

Таблица 3. Результаты распознавания рода для последовательностей геномов коронавируса из базы GenBank с помощью правила вариантного подхода

Число одинаковых компонент вариантной строки	α -CoV Всего геномов: 924	β -CoV Всего геномов: 1954	δ -CoV Всего геномов: 19	γ -CoV Всего геномов: 345
6	687	1867	16	192
5	168	11	0	149
4	50	9	1	0
Распознано геномов:	905	1887	17	341

3.1. Мозаичность геномов коронавируса

В случаях, когда не все компоненты одинаковы, пять одинаковых компонент встречаются наиболее

часто (см. табл. 3). В качестве примера рассмотрим результаты применения вариантного подхода к распознаванию рода γ -CoV в специальной выборке 149 геномов коронавируса этого рода из базы GenBank (см. табл.3). Среди всех 149 геномов вариантные строки имеют пять одинаковых компонент (с первой по четвертую и шестую), правильно определяющих род γ -CoV. Ошибка в определении рода во всех этих строках находится в пятой компоненте, соответствующей S-гену спайк-белка. При этом пятая компонента указывает только на род α -CoV (25 геномов) или род β -CoV (124 генома). Аналогичное явление мозаичности можно наблюдать при распознавании рода α -CoV на основе N-гена белка нуклеокапсида. Несмотря на то, что для родов β -CoV, δ -CoV и γ -CoV распознавание на основе N-гена белка нуклеокапсида имеет, практически, 100%-ю надежность, при распознавании рода α -CoV выявляется 131 случай, в которых статистики (3) указывают на род β -CoV. Можно отметить, что при обмене S-генами спайк-белка коронавирусы различных родов теоретически могут изменить специфичность связывания клеточных рецепторов при инфицировании клетки и, тем самым совершить переход к освоению новых хозяев.

4. Заключение

Таргетный анализ вирусных геномов позволяет выявлять фрагменты генома, надежно идентифицирующие его таксономическую принадлежность, как это было показано при определении вида флавивирусов и рода у коронавирусов. Кроме того, такой анализ выявляет мозаичность генома, возникающую вследствие гомологичной рекомбинации его участков. Таргетный анализ в сочетании с вариантным подходом, в частности, может быть использован при проведении метагеномных исследований микробиологического состава природной среды для идентификации выделенных вирусов.

5. Список литературы

1. Жданов В.М., Львов Д.К. *Эволюция возбудителей инфекционных болезней*. – М.: Медицина, 1984. 268 с.
2. Wolfe N.D., Dunavan C.P., Diamond J. Origins of major human infectious diseases. *Nature*. 2007; 447(7142): 279–83. doi: [10.1038/nature05775](https://doi.org/10.1038/nature05775)
3. Львов Д.К. Рождение и развитие вирусологии – история изучения новых и возвращающихся вирусных инфекций. *Вопросы вирусологии*. 2012. Приложение 1. С. 5–20.
4. Ястребов В.К., Якименко В.В. Омская геморрагическая лихорадка: итоги исследований (1946–2013 гг.). *Вопросы вирусологии*. 2014. Т. 59. № 6. С. 5–11.
5. Макаров В.В., Лозовой Д.А. *Новые особо опасные инфекции, ассоциированные с*

рукокрыльями. Владимир: РУДН, ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2016. 160 с.

6. Леншин С.В., Ромашин А.В., Вышемирский О.И., Львов Д.К., Альховский С.В. Летучие мыши субтропической зоны Краснодарского края России как возможный резервуар зоонозных вирусных инфекций. *Вопросы вирусологии*. 2021. Т. 66. № 2. С. 112–122. doi: [10.36233/0507-4088-41](https://doi.org/10.36233/0507-4088-41)
7. Wagner E., Shin A., Tukhanova N., et al. First Indications of Omsk Haemorrhagic Fever Virus beyond Russia. *Viruses*. 2022. V. 14. Article 754. doi: [10.3390/v14040754](https://doi.org/10.3390/v14040754)
8. *Bats and Viruses: Current Research and Future Trends*. Eds. Corrales-Aguilar E., Schwemmler M. Caister: Academic Press, 2020.
9. Long S.W., Olsen R.J., Christensen P.A., et al. Sequence Analysis of 20453 Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus 2 genomes from the Houston metropolitan area identifies the emergence and widespread distribution of multiple isolates of all major variants of concern. *Am. J. Pathol.* 2022. V. 191. No. 6. P. 983–992. doi: [10.1016/j.ajpath.2021.03.004](https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2021.03.004)
10. Борисова Н.И., Котов И.А., Колесников А.А., Каптелова В.В., Сперанская А.С., Кондрашева Л.Ю., Тиванова Е.В., Хафизов К.Ф., Акимкин В.Г. Мониторинг распространения вариантов SARSCoV-2 (Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus) на территории Московского региона с помощью таргетного высокопроизводительного секвенирования. *Вопросы вирусологии*. 2021. Т. 66. № 4. С. 269–278. doi: [10.36233/0507-4088-72](https://doi.org/10.36233/0507-4088-72)
11. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, et al. GenBank. *Nucleic. Acids Res.* 2013. V. 41 (Database issue). P. D36–42. doi: [10.1093/nar/gks1195](https://doi.org/10.1093/nar/gks1195)
12. Бюллетень нормативных и методических документов госсанэпиднадзора. 2016. Т. 3. № 65. С. 25–38.
13. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020. V. 579. P. 270–273. doi: [10.1038/s41586-020-2012-7](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7)
14. Чалей М.Б., Тюлько Ж.С., Кутыркин В.А. Распознавание видов флавивирусов на основе кодирующих последовательностей полипротеинов. *Математическая биология и биоинформатика*. 2019. Т. 14. № 2. С. 533–542. doi: [10.17537/2019.14.533](https://doi.org/10.17537/2019.14.533)
15. Чалей М.Б., Кутыркин В.А. Распознавание рода коронавируса на основе прототипных штаммов. *Математическая биология и биоинформатика*. 2022. Т. 17. № 1. С. 10–27. doi: [10.17537/2022.17.10](https://doi.org/10.17537/2022.17.10)
16. Gould E.A., de Lamballerie X., Zanutto P.M., Holmes E.C. Origins, evolution, and vector/host coadaptations within the genus Flavivirus. *Adv.*

- Virus Res.* 2003. V. 59. P. 277–314. doi: [10.1016/s0065-3527\(03\)59008-x](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(03)59008-x)
17. de A. Zanutto P.M., Gould, E.A. In: *The Molecular Epidemiology of Human Viruses*. Ed. Leitner T. Boston, MA: Springer, 2002. P. 167–195. doi: [10.1007/978-1-4615-1157-1_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1157-1_8)
 18. Львов Д.К., Альховский С.В. Истоки пандемии COVID-19: экология и генетика коронавирусов (Betacoronavirus: Coronaviridae) SARS-CoV, SARS-CoV-2 (подрод Sarbecovirus), MERS-CoV (подрод Merbecovirus). *Вопросы вирусологии*. 2020. Т. 65. № 2. С. 62–70. doi: [10.36233/0507-4088-2020-65-2-62-70](https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-62-70)
 19. Ботвинкин А.Д. Вирусы и летучие мыши: междисциплинарные проблемы. *Вопросы вирусологии*. 2021. Т. 66. № 4. С. 259–268.
 20. Львов Д.К., Борисевич С.В., Альховский С.В., Бурцева Е.И. Актуальные подходы к анализу вирусных геномов в интересах биобезопасности. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2019. Т. 8. № 2. С. 96–101. doi: [10.24411/2305-3496-2019-12012](https://doi.org/10.24411/2305-3496-2019-12012)
 21. Супотницкий М.В. *COVID-19 трудный экзамен для человечества*. Москва: «Русская панорама», 2021. 256 с.
 22. Щелканов М.Ю., Попова А.Ю., Дедков В.Г., Акимкин В.Г., Малеев В.В. История изучения и современная классификация коронавирусов (Nidovirales: Coronaviridae). *Инфекция и иммунитет*. 2020. Т. 10. № 2. С. 221–246. doi: [10.15789/2220-7619-HOI-1412](https://doi.org/10.15789/2220-7619-HOI-1412)