

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Анализ циркуляции коронавируса человека

Яцышина С.Б., Мамошина М.В., Шипулина О.Ю., Подколзин А.Т., Акимкин В.Г.

ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, Москва, Россия

Введение. Появление в конце 2019 г. нового коронавируса SARS-CoV-2, ставшего причиной пандемии, породило массу вопросов относительно эпидемиологии нового заболевания COVID-19 и известных ранее инфекций, вызываемых коронавирусами, которым по причине более лёгкого течения заболеваний уделяли мало внимания.

Цель данной работы – многолетнее ретроспективное исследование распространённости и особенностей циркуляции эпидемических коронавирусов человека в Москве при проведении рутинного скрининга.

Материал и методы. Методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени исследовали на РНК эпидемических коронавирусов человека (HCoV) мазки из носо- и ротоглотки 16 511 больных острой респираторной инфекцией (ОРИ) в возрасте от 1 мес до 95 лет (58,3% составили дети), собранные с января 2016 г. по март 2020 г., и мазки 505 условно-здоровых детей, собранные в 2008, 2010 и 2011 гг.

Результаты. HCoV обнаруживали у 2,6–6,1% обследованных больных в год, статистически значимо чаще у взрослых по сравнению с детьми, без различий по полу. На пике заболеваемости в декабре 2019 г. HCoV обнаружены у 13,7% обследованных, что в 2 раза выше среднемноголетнего уровня данного месяца. У больных ОРИ детей до 6 лет HCoV выявляли статистически значимо чаще, чем у здоровых (3,7 vs 0,7%, $p = 0,008$).

Заключение. HCoV циркулируют ежегодно, демонстрируя в Московском регионе зимне-весеннюю сезонность с пиком в декабре. За годы наблюдения эпидемическая активность HCoV росла до максимальных значений в декабре 2019 г. – феврале 2020 г., снизившись в марте до среднемноголетнего уровня. На фоне растущего количества случаев завоза SARS-CoV-2 в Москву в марте 2020 г. частота выявления HCoV резко понизилась, что, по-видимому, отражает наличие конкуренции между разными коронавирусами и подтверждает специфичность выявления HCoV использованным в данной работе диагностическим набором.

Ключевые слова: коронавирусы; полимеразная цепная реакция; сезонность; эпидемическая активность.

Для цитирования: Яцышина С.Б., Мамошина М.В., Шипулина О.Ю., Подколзин А.Т., Акимкин В.Г. Анализ циркуляции коронавируса человека. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(5): 267-275.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-5-3>

Для корреспонденции: Яцышина Светлана Борисовна, канд. биол. наук, руководитель Научной группы по разработке новых методов диагностики ОРЗ, ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, Москва. E-mail: svetlana.yatsyshina@pcr.ms

Участие авторов: Яцышина С.Б. – дизайн исследования, анализ результатов и написание текста; Мамошина М.В. – статистическая обработка данных, оформление списка литературы; Шипулина О.Ю. – организация и проведение лабораторных исследований; Подколзин А.Т. – концепция и дизайн исследования; Акимкин В.Г. – организация выполнения исследования.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 02.06.2020
Принята в печать 31.08.2020

Analysis of human coronaviruses circulation

Svetlana B. Yatsyshina, Marina V. Mamoshina, Olga Yu. Shipulina, Alexandr T. Podkolzin, Vasilij G. Akimkin

Central Research Institute for Epidemiology of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Moscow, 111123, Russia

Introduction. The novel SARS-CoV-2 coronavirus, which emerged at the end of 2019 and caused a worldwide pandemic, triggered numerous questions about the epidemiology of the novel COVID-19 disease and about well-known coronavirus infections, which used to be given little attention due to their mild symptoms.

The purpose: The routine screening-based multiyear retrospective observational study of prevalence and circulation patterns of epidemic-prone human coronaviruses in Moscow.

Material and methods. The real-time polymerase chain reaction was used to detect RNA of human coronaviruses (HCoV) in nasal and throat swabs from 16,511 patients with acute respiratory infection (ARI), aged 1 month to 95

years (children accounted for 58.3%) from January 2016 to March 2020, and swabs from 505 relatively healthy children in 2008, 2010 and 2011.

Results. HCoV were yearly found in 2.6–6.1% of the examined patients; the detection frequency was statistically higher in adults than in children, regardless of sex. At the height of the disease incidence in December 2019, HCoVs were detected in 13.7% of the examined, demonstrating a two-fold increase as compared to the multi-year average for that month. The statistical frequency of HCoV detection in ARI pediatric patients under 6 years was significantly higher than in their healthy peers (3.7 vs 0.7%, $p = 0.008$).

Conclusion. HCoVs circulate annually, demonstrating a winter-spring seasonal activity pattern in the Moscow Region and reaching peak levels in December. Over the years of observation, the HCoV epidemic activity reached maximum levels in December 2019 – February 2020 and decreased in March to the multi-year average. Amid a growing number of SARS-CoV-2 cases imported to Moscow in March 2020, the HCoV detection frequency dropped sharply, which, apparently, can be explained by the competition between different coronaviruses and by the specificity of HCoV detection with the diagnostic test kit used in this study.

Keywords: coronaviruses; polymerase chain reaction; seasonality; epidemic activity.

For citation: Yatsyshina S.B., Mamoshina M.V., Shipulina O.Yu., Podkolzin A.T., Akimkin V.G. Analysis of human coronaviruses circulation. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2020; 65(5): 267-275. (In Russ., in Engl.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-5-3>

For correspondence: Svetlana B. Yatsyshina, PhD. Sci. Biol., Head of the Scientific Group on the Development of New Diagnostic Methods of ARI diagnostics, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, 111123, Russia. E-mail: svetlana.yatsyshina@pcr.ms

Information about the authors:

Yatsyshina S.B., <https://orcid.org/0000-0003-4737-941X>

Mamoshina M.V., <https://orcid.org/0000-0002-1419-7807>

Shipulina O.Yu., <https://orcid.org/0000-0003-4679-6772>

Podkolzin A.T., <https://orcid.org/0000-0002-0044-3341>

Akimkin V.G., <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

Contribution: Yatsyshina S.B. – research design, analysis of the results and writing of the text; Mamoshina M.V. – statistical data processing, drawing up the list of references; Shipulina O.Yu. – organization and conduct of laboratory research; Podkolzin A.T. – research concept and design; Akimkin V.G. – organization of research.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 2 June 2020
Accepted 31 August 2020

Введение

Коронавирусы, как возбудители инфекций животных и человека, широко распространены в природе. Они относятся к семейству *Coronaviridae*, подсемейству *Orthocoronavirinae*, в котором выделяют 4 рода: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* и *Gammacoronavirus* [1]. Представители родов *Gammacoronavirus* и *Deltacoronavirus* инфицируют преимущественно птиц. Вирусы родов *Alphacoronavirus* и *Betacoronavirus* обнаруживают у млекопитающих.

Коронавирусы человека (HCoV), циркулирующие ежегодно в популяции людей, т. е. эпидемические коронавирусы, вызывают острые респираторные инфекции (ОРИ) [2], затрагивающие, как правило, верхние дыхательные пути [3–6]. В редких случаях они ассоциируются с поражением нижних дыхательных путей [7], описаны случаи выделения коронавирусов человека от больных пневмонией [8].

Среди эпидемических коронавирусов человека (HCoVs) в настоящее время выделяют 4 вида.

Human coronavirus 229E (род *Alphacoronavirus* подрод *Duvinacovirus*) и *Betacoronavirus 1* (ранее назывался HCoV-OC43; род *Betacoronavirus* подрод *Embecovirus*) известны с середины 1960-х гг. *Human coronavirus NL63* (род *Alphacoronavirus*, подрод *Setracovirus*) и *Human coronavirus HKU1* (род *Betacoronavirus* под-

род *Embecovirus*) были открыты в 2004 и 2005 гг. соответственно.

Вирионы коронавирусов представляют собой частицы размером 120 нм, сферической формы, содержащие нуклеокапсид (геномную РНК, связанную с нуклеопротеином (N)) спиральной формы, покрытый липидной мембраной со встроенными белками: гликопротеином (spike, S), формирующим булавовидные отростки, гемагглютинин-эстеразой (HE), мембранным протеином (M) и малым мембранным протеином оболочки (E) [9]. Проникновение в клетки слизистых оболочек происходит посредством связывания гликопротеина S со специфичными рецепторами, причём коронавирусы животных и разные виды HCoVs используют для этого различные рецепторы [10].

Геном коронавирусов, самый протяжённый среди всех РНК-содержащих вирусов, представлен однонитевой линейной молекулой РНК положительной полярности размером 27–32 тыс. нуклеотидов.

В результате рекомбинации РНК коронавирусов разных видов могут появляться новые варианты, приобретающие нехарактерный тканевый тропизм, более высокую вирулентность и способность преодолевать межвидовой барьер [11–13]. Подобные рекомбинационные события между геномами коро-

навирусов летучих мышей и других животных, закреплённые естественным отбором, способствовали появлению в популяции людей высоковирулентных для человека коронавирусов: SARS-CoV, возбудителя тяжёлого острого респираторного синдрома (ТОРС) [14, 15], MERS-CoV, возбудителя ближневосточного респираторного синдрома [16], и SARS-CoV-2, возбудителя COVID-19 [17], в 2002, 2012 и 2019 гг. соответственно.

HCoV, по-видимому, также возникли в результате рекомбинационных событий с участием разных видов коронавирусов млекопитающих [18, 19], с которыми они имеют общего предка, существовавшего миллионы лет назад [20].

Сведения об эпидемиологии инфекции, вызванной HCoV, отрывочны: полученные в разные годы в отдельных группах пациентов, они не позволяют однозначно судить о сезонности коронавирусной инфекции и распространённости HCoV в различных возрастных группах больных ОРВИ. Разные исследователи сообщают о зимних, весенних или летних подъёмах заболеваемости [21–27].

Долгосрочные исследования циркуляции коронавирусов человека в России не проводили.

Целью данной работы стало многолетнее ретроспективное исследование распространённости эпидемических коронавирусов человека в Москве при проведении рутинного скрининга методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени.

Материал и методы

Исследовали мазки из носо- и ротоглотки 16 511 пациентов с симптомами ОРВИ, собранные с января 2016 г. по март 2020 г. в процессе рутинного скрининга по определению этиологии ОРВИ в Москве. Известно о возрасте 16 385 человек, о поле 16 404 обследованных. Возраст больных варьировал от 1 мес до 95 лет, 58,3% обследованных составили дети в возрасте от 1 мес до 18 лет.

В анализ также включены результаты исследования мазков из носо- и ротоглотки, собранных в 2008, 2010 и 2011 гг. у 505 условно-здоровых детей без признаков респираторной инфекции на момент обследования в возрасте от 1 мес до 18 лет (56,2% младше 6 лет) [28].

РНК HCoV обнаруживали с дифференциацией по родам: *Alphacoronavirus* (HCoV NL63 и HCoV 229E) и *Betacoronavirus* (HCoV HKU1, HCoV OC43) методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени с помощью набора реагентов «АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) по инструкции производителя на приборах для ПЦР с детекцией в режиме реального времени: Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH, Германия), ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Мазок из носо- и ротоглотки брали согласно методическим рекомендациям «Лабораторная диагностика гриппа и других ОРВИ методом полимеразной цепной реакции» МР 3.1.0117-17 и клиническим рекомендациям «Лабораторная диагностика гриппа

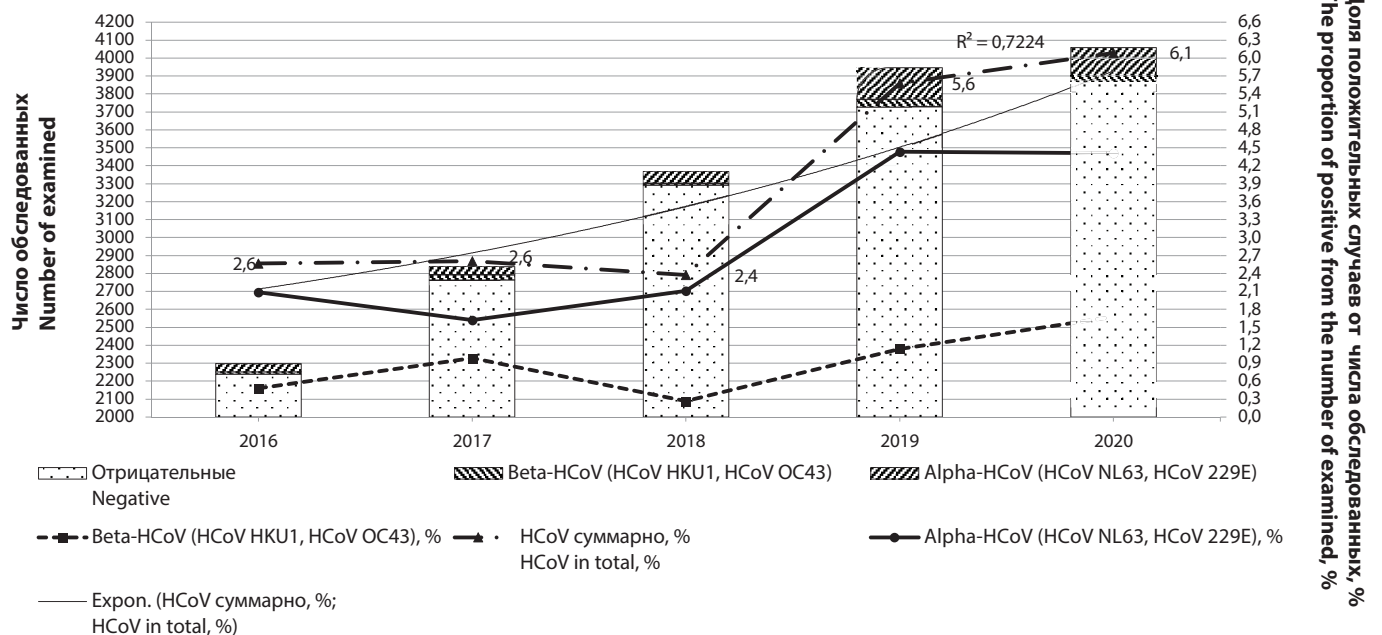


Рис. 1. Распространённость эпидемических коронавирусов в динамике за 5 лет.

По оси абсцисс – годы наблюдения (с января 2016 г. по март 2020 г.); по оси ординат слева – абсолютное число обследованных и положительных случаев, справа – доля положительных случаев.

Fig. 1. Prevalence of epidemic-prone coronaviruses over 5 years.

The horizontal line – years of observation (from January 2016 to March 2020); the vertical line, on the left – the absolute number of the observed and positive cases; on the right – the proportion of positive cases.

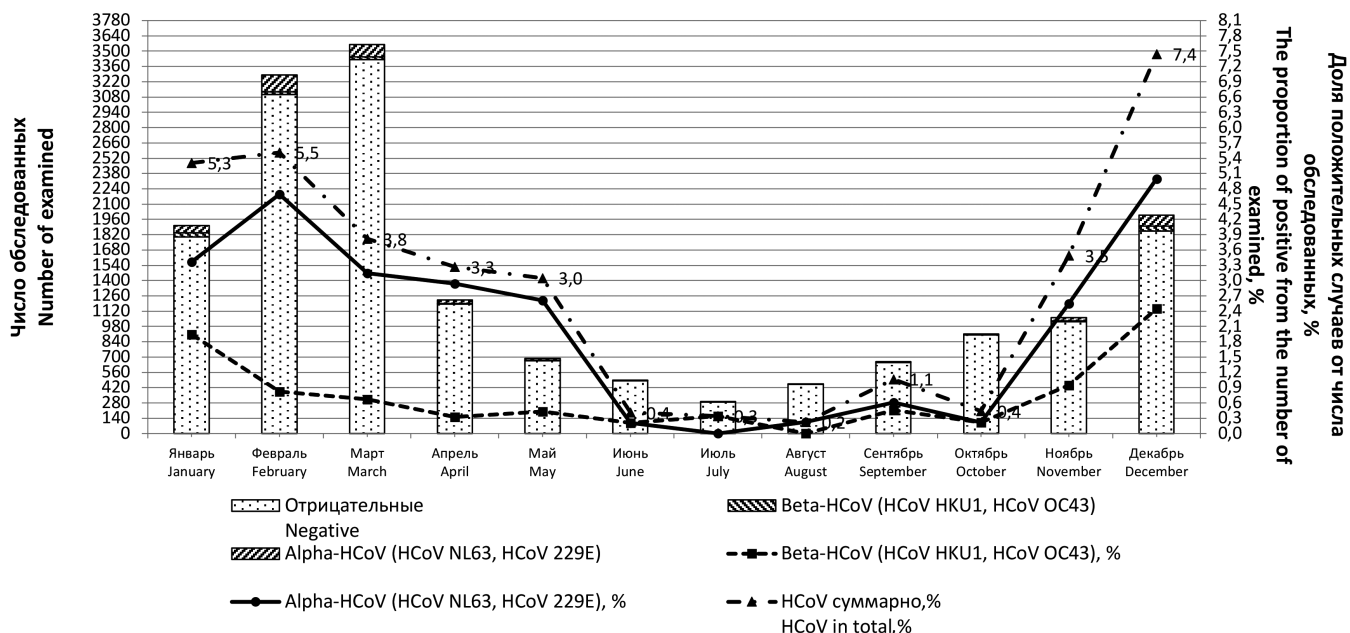


Рис. 2. Сезонная распространённость эпидемических коронавирусов за 5 лет наблюдения (с января 2016 г. по март 2020 г.).

По оси абсцисс – месяцы наблюдения. По оси ординат слева – совокупное абсолютное число обследованных и положительных случаев, справа – доля положительных случаев ежемесячно за весь период наблюдения.

Fig. 2. Seasonal prevalence of epidemic-prone coronaviruses over 5 years of observation (from January 2016 to March 2020).

The horizontal line – months of observation. The vertical line, on the left – the total absolute number of the observed and positive cases; on the right – the proportion of positive cases per month for the entire observation period.

и других ОРВИ методом полимеразной цепной реакции» (2016 г.)¹, объединяя в пробирке с 0,5 мл транспортной среды, и хранили до исследования при температуре от +4 до +8 °C не более 3 сут.

Статистический анализ включал проверку распределений на нормальность и расчёт критерия χ^2 Пирсона с использованием программы SPSS Statistics v. 18, 95% доверительный интервал (ДИ) вычисляли по методу Вальда [29].

Результаты

НCoVs обнаруживались ежегодно, демонстрируя экспоненциальную динамику увеличения к 2020 г. доли положительных находок с 2,6 до 6,1% числа обследованных больных. Вирусы, относящиеся к роду *Alphacoronavirus* (Alpha-HCoV), ежегодно встречались в 1,5–3 раза чаще, чем *Betacoronavirus* (Beta-HCoV) (рис. 1).

В циркуляции НCoVs наблюдалась выраженная зимне-весенняя сезонность (рис. 2). Подъём заболеваемости, вызванной НCoVs, отмечался с ноября по май, когда они выявлялись более чем у 3% обследованных с ОРВИ; пик приходился на декабрь–февраль (7,4–5,5%). В летние месяцы доля инфицированных НCoVs не превышала 0,5% (см. рис. 2). Частота обнаружения Alpha-HCoV ежемесячно была в несколько раз выше, чем Beta-HCoV.

С ноября 2019 г. по февраль 2020 г. отмечено превышение эпидемической активности НCoVs: уве-

личение частоты выявления в 2 раза относительно среднемноголетнего уровня (СМУ) для каждого месяца наблюдения. На пике подъёма в декабре 2019 г. (рис. 3) частота выявления НCoVs составила 13,7% (СМУ 7,0%), в январе–феврале – 8% (СМУ 3,1 и 4,2%), а в марте резко снизилась до 4,1% (СМУ 4,2%).

Представляет интерес вопрос распространённости инфекции у больных разного пола и возраста.

Суммарная доля коронавирусной инфекции среди больных ОРВИ женщин оказалась выше, чем мужчин (4,6 vs 3,7; $p = 0,013$), однако в разные годы эти показатели варьировали (табл. 1), что не позволяет сделать вывод о наличии статистически значимых различий распространённости НCoVs у лиц разного пола.

Распространённость коронавирусной инфекции у больных ОРВИ разного возраста отражена в табл. 2. Чёткий возрастной пик отсутствует, однако в целом НCoVs статистически чаще выявлялись у взрослых, чем у детей (5,43%; 95% ДИ 4,92–6,0 vs 3,19%; 95% ДИ 2,86–3,56; $p < 0,01$) (рис. 4).

При обследовании группы детей без симптомов ОРВИ НCoVs были обнаружены в 12 (2,1%; 95% ДИ 1,23–4,11%) из 505 случаев, положительные результаты встречались во все сезоны, однако более половины из них (7 случаев) были выявлены весной.

У условно-здоровых детей в возрасте до 6 лет НCoVs выявлялись статистически значимо реже, чем у детей того же возраста с симптомами ОРВИ (0,7% vs 3,7%; $p = 0,008$). Распространённость НCoVs у больных ОРВИ старше 6 лет и условно-здоровых того же возраста не имела статистически значимых различий: 66 (2,4%) из 2803 vs 10 (4,5%) из 221 ($p = 0,047$).

¹Клинические рекомендации. https://fedlab.ru/upload/medialibrary/b71/_-_-_-_-06122016.pdf (дата обращения: 23.06.2020).

Обсуждение

Полученные данные свидетельствуют о том, что НСoVs циркулируют ежегодно, их активность в Московском регионе повышается в зимне-весенний период с пиком в декабре. Выявленный нами характер сезонности согласуется с данными исследования в Норвегии [30], тогда как в Израиле и Гонконге отмечена весенне-летняя активность [27, 31]. По-видимому, это связано с климатическими особенностями регионов, влияющими на циркуляцию НСoVs, как и других респираторных вирусов [32].

Частота выявления НСoVs в нашем исследовании соответствует таковой в других странах [2, 27, 30, 33].

К сожалению, большинство опубликованных исследований касались только детского контингента. В единственном опубликованном исследовании, проведённом в США на выборке больных в возрасте 0–96 лет, средний возраст инфицированных НСoVs составил 22 года [33]. По нашим данным, средний возраст больных, инфицированных НСoVs, – 24 года, медиана – 23 года.

НСoVs обнаружены нами у 2,1% условно-здоровых детей. Сходные с нашими результаты (1,9%) получе-

Таблица 1. Частота выявления коронавирусов у больных острыми респираторными инфекциями разного пола

Table 1. Coronavirus detection frequency in female and male patients with acute respiratory infection

Годы Years	Женщины Females				Мужчины Males			
	количество обследованных number of the examined	число лиц с положительным результатом исследования на Beta-НСoV, абс. (%) number of individuals tested positive for Beta-НСoV, abs. (%)	число лиц с положительным результатом исследования на Alpha-НСoV, абс. (%) number of individuals tested positive for Alpha-НСoV, abs. (%)	общее число лиц с положительным результатом исследования на НСoV, абс. (%) total number of individuals tested positive for НСoV, abs. (%)	количество обследованных number of the examined	число лиц с положительным результатом исследования на Beta-НСoV, абс. (%) number of individuals tested positive for Beta-НСoV, abs. (%)	число лиц с положительным результатом исследования на Alpha-НСoV, абс. (%) number of individuals tested positive for Alpha-НСoV, abs. (%)	общее число лиц с положительным результатом исследования на НСoV, абс. (%) total number of individuals tested positive for НСoV, abs. (%)
2016	1115	7 (0,63; 95% ДИ* 0,25–1,29)	29 (2,60; 95% ДИ 1,75–3,71)	36 (3,23; 95% ДИ 2,27–4,44)	1167	4 (0,34; 95% ДИ 0,09–0,88)	18 (1,54; 95% ДИ 0,92–2,43)	22 (1,89; 95% ДИ 1,19–2,84)
2017	1352	10 (0,74; 95% ДИ 0,36–1,36)	21 (1,55; 95% ДИ 0,96–2,36)	31 (2,29; 95% ДИ 1,56–3,24)	1453	18 (1,24; 95% ДИ 0,74–1,95)	25 (1,72; 95% ДИ 1,12–2,53)	43 (2,96; 95% ДИ 2,15–3,97)
2018	1687	5 (0,30; 95% ДИ 0,1–0,69)	45 (2,67; 95% ДИ 1,95–3,55)	50 (2,96; 95% ДИ 2,21–3,89)	1671	4 (0,24; 95% ДИ 0,07–0,61)	26 (1,56; 95% ДИ 1,02–2,27)	30 (1,80; 95% ДИ 1,21–2,55)
2019	1966	29 (1,48; 95% ДИ 0,99–2,11)	104 (5,29; 95% ДИ 4,34–6,37)	133 (6,77; 95% ДИ 5,69–7,97)	1955	16 (0,82; 95% ДИ 0,47–1,33)	70 (3,58; 95% ДИ 2,8–4,5)	86 (4,40; 95% ДИ 3,53–5,4)
2020 (январь–март) (January–March)	2085	39 (1,87; 95% ДИ 1,33–2,55)	87 (4,17; 95% ДИ 3,36–5,12)	126 (6,04; 95% ДИ 5,06–7,15)	1953	29 (1,48; 95% ДИ 1,0–2,13)	91 (4,66; 95% ДИ 3,77–5,69)	120 (6,14; 95% ДИ 5,12–7,3)
Всего Total	8205	90 (1,10; 95% ДИ 0,88–1,35)	286 (3,49; 95% ДИ 3,11–3,91)	376 (4,58; 95% ДИ 4,15–5,06)	8199	71 (0,87; 95% ДИ 0,68–1,09)	230 (2,81; 95% ДИ 2,47–3,19)	301 (3,67; 95% ДИ 3,28–4,1)

Примечание. * Здесь и в табл. 2: ДИ – доверительный интервал.

Note. * Here and in table 2: CI – confidence interval.

Таблица 2. Распространённость коронавирусов в разных возрастных группах больных острыми респираторными инфекциями

Table 2. Coronavirus prevalence in different age groups of patients with acute respiratory infection

Возраст, годы Age, years	Количество обследованных Number of the examined	Число лиц с положительным результатом исследования на НСoV, абс. (%) Number of individuals tested positive for НСoV, abs. (%)	Число лиц с положительным результатом исследования на Beta-НСoV, абс. (%) Number of individuals tested positive for Beta-НСoV, abs. (%)	Число лиц с положительным результатом исследования на Alpha-НСoV, абс. (%) Number of individuals tested positive for Alpha-НСoV, abs. (%)
< 1	1451	50 (3,45; 95% ДИ 2,57–4,52)	14 (0,96; 95% ДИ 0,53–1,61)	36 (2,48; 95% ДИ 1,74–3,42)
1–2	1259	47 (3,73; 95% ДИ 2,76–4,93)	10 (0,79; 95% ДИ 0,38–1,46)	37 (2,94; 95% ДИ 2,08–4,03)
3–5	4042	142 (3,51; 95% ДИ 2,97–4,13)	37 (0,92; 95% ДИ 0,65–1,26)	105 (2,60; 95% ДИ 2,13–3,14)
6–17	2803	66 (2,35; 95% ДИ 1,83–2,99)	16 (0,57; 95% ДИ 0,33–0,93)	50 (1,78; 95% ДИ 1,33–2,35)
18–44	5003	253 (5,06; 95% ДИ 5,26–5,7)	58 (1,16; 95% ДИ 0,88–1,5)	195 (3,90; 95% ДИ 2,19–4,47)
45–59	1213	83 (6,84; 95% ДИ 5,49–8,41)	20 (1,65; 95% ДИ 1,01–2,54)	63 (5,19; 95% ДИ 4,01–6,6)
> 60	614	35 (5,70; 95% ДИ 4,0–7,84)	4 (0,65; 95% ДИ 0,18–1,66)	31 (5,05; 95% ДИ 3,46–7,09)

ны исследователями из Словении [25]. В Нидерландах HCoVс выявляли у детей контрольной группы с большей частотой (10%) [30].

В нашем исследовании у детей в возрасте до 6 лет с симптоматикой ОРВИ статистически значимо чаще обнаруживались HCoVс, чем у здоровых того же возраста, аналогично данным исследователей из Словении [25]. Тогда как среди детей 6–18 лет частота выявления HCoVс у больных и здоровых была практически одинакова, что совпадает с данными норвежских исследователей [30].

Такие возрастные различия, по-видимому, можно объяснить более лёгким и даже бессимптомным течением инфекции у детей старшего возраста вследствие приобретённого анамнестического иммунитета. У больных ОРВИ взрослых распространённость коро-

навирусной инфекции оказалась выше, чем у детей, что может быть связано со снижением анамнестического иммунитета с возрастом.

Оба рода HCoVс демонстрировали одинаковую сезонность циркуляции, но сезонные подъёмы заболеваемости Beta-HCoV не были столь выраженными по сравнению с Alpha-HCoV, а распространённость первого среди детей и взрослых была практически одинаковой.

По данным сероэпидемиологических исследований, IgG к разным видам HCoVс обнаруживаются довольно часто, особенно у взрослых. От 91 до 100% обследованных в США лиц старше 50 лет имели IgG ко всем четырём HCoVс в сыворотке крови и в 8–30% случаев – секретируемые слизистой носоглотки IgA, что свидетельствует о широкой распространённости

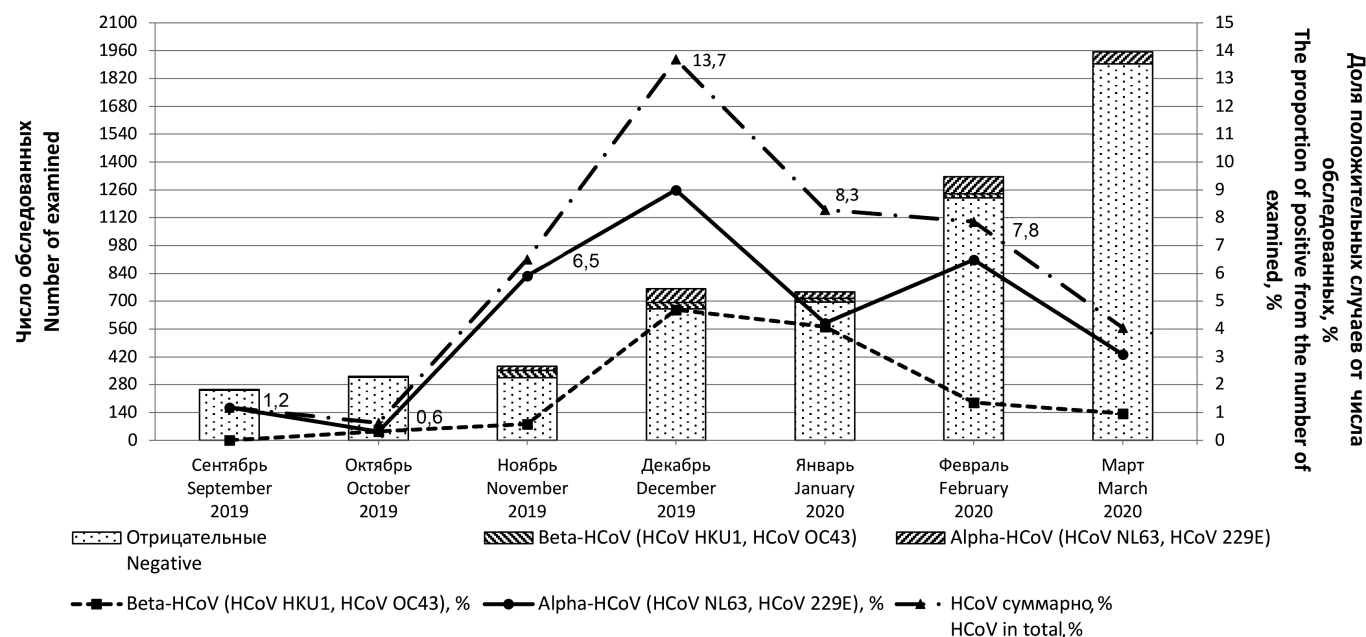


Рис. 3. Распространённость эпидемических коронавирусов с сентября 2019 г. по март 2020 г.

Fig. 3. Prevalence of epidemic-prone coronaviruses from September 2019 to March 2020.

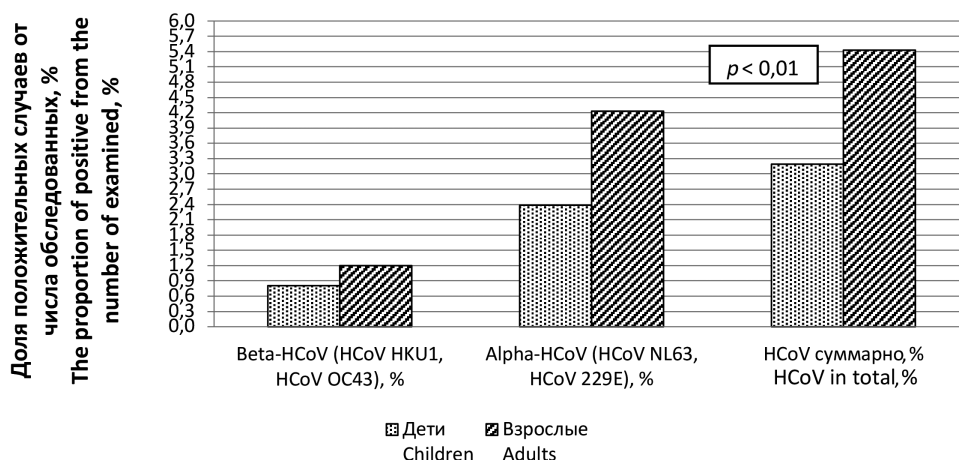


Рис. 4. Распространённость эпидемических коронавирусов у детей и взрослых. Вертикальная шкала – доля положительных случаев.

Fig. 4. Prevalence of epidemic-prone coronaviruses in children and adults. The vertical line – the proportion of positive cases.

инфекции и возможности повторного заражения коронавирусами одного и того же вида [34].

Экспериментальным путём показано отсутствие кросс-реактивности нейтрализующих антител к HCoV разных родов и внутри одного рода Beta-HCoV [35, 36].

Наши данные о более высокой частоте выявления HCoV у взрослых, чем у детей, в совокупности с результатами иммунологических исследований зарубежных коллег позволяют предполагать формирование непродолжительной иммунологической защиты после инфицирования и возможность повторных случаев заражения HCoV разных видов.

Более резкое по сравнению с предыдущими сезонами снижение частоты обнаружения HCoV в марте 2020 г. на фоне роста случаев завоза SARS-CoV-2 в Москву может быть следствием конкуренции между разными коронавирусами и, бесспорно, подтверждает специфичность выявления РНК HCoV использованным в данной работе диагностическим набором.

Заключение

Проведённое ретроспективное исследование позволило оценить распространённость и выявить особенности циркуляции HCoV в Москве за 5 лет (с 2016 по 2020 гг.). Циркуляция HCoV характеризовалась зимне-весенней сезонностью с преобладанием Alpha-HCoV, без различий по полу. Распространённость HCoV варьировала от 2,6 до 6,1% числа обследованных больных в год с превышением в 2 раза СМУ в эпидемическом сезоне 2019–2020 гг. У детей до 6 лет с симптомами ОРВИ HCoV выявлялись статистически значимо чаще, чем у условно-здоровых того же возраста, что свидетельствует о значимости возбудителей для развития инфекции. При инфицировании HCoV детей старшего возраста, возможно, имеющих защитный анамнестический иммунитет, заболевание, по-видимому, протекает в лёгкой и бессимптомной форме, что может объяснять одинаковую частоту выявления вирусов у лиц с наличием и отсутствием респираторной симптоматики. Обнаруженный нами рост частоты выявления HCoV у взрослых можно объяснить отсутствием перекрёстной реакции нейтрализующих антител к разным HCoV и снижением уровня антител с возрастом.

В последние годы эпидемическая активность коронавируса человека нарастала, достигнув максимума в декабре 2019 г. – феврале 2020 г., что совпало с появлением в Китае нового коронавируса SARS-CoV-2, относящегося к роду *Betacoronavirus*. Это совпадение могло быть не случайностью, а закономерным отражением активизации эволюционных процессов в популяции коронавируса млекопитающих, изучение которых заслуживает отдельного внимания.

ЛИТЕРАТУРА

- de Groot R.J., Baker S.C., Baric R., Enjuanes L., Gorbalenya A.E., Holmes K.V., et al. Family Coronaviridae. In: King A.M., Lefkowitz E., Adams M.J., Carstens E.B. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London, San Diego: Elsevier Academic Press; 2011.

- Cabeça T.K., Granato C., Bellei N. Epidemiological and clinical features of human coronavirus infections among different subsets of patients. *Influenza Other Respir. Viruses*. 2013; 7(6): 1040-7. DOI: <http://doi.org/10.1111/irv.12101>
- Bradburne A.F., Bynoe M.L., Tyrrell D.A. Effects of a «new» human respiratory virus in volunteers. *Br. Med. J.* 1967; 3(5568): 767-9. DOI: <http://doi.org/10.1136/bmj.3.5568.767>
- Esposto S., Bosis S., Niesters H.G.M., Tremolati E., Begliatti E., Rognoni A., et al. Impact of human coronavirus infections in otherwise healthy children who attended an emergency department. *J. Med. Virol.* 2006; 78(12): 1609-15. DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.20745>
- Dare R.K., Fry A.M., Chittaganpitch M., Sawanpanyalert P., Olsen S.J., Erdman D.D. Human coronavirus infections in rural Thailand: a comprehensive study using real-time reverse-transcription polymerase chain reaction assays. *J. Infect. Dis.* 2007; 196(9): 1321-8. DOI: <http://doi.org/10.1086/521308>
- Николаева С.В., Зверева З.А., Каннер Е.В., Яцшина С.Б., Усенко Д.В., Горелов А.В. Клинико-лабораторная характеристика коронавирусной инфекции у детей. *Инфекционные болезни*. 2018; 16(1): 35-9. DOI: <http://doi.org/10.20953/1729-9225-2018-1-35-39>
- Gaunt E.R., Hardie A., Claas E.C.J., Simmonds P., Templeton K.E. Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR method. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(8): 2940-7. DOI: <http://doi.org/10.1128/JCM.00636-10>
- Woo P.C.Y., Lau S.K.P., Chu C., Chan K., Tsoi H., Huang Y., et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J. Virol.* 2005; 79(2): 884-95. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.79.2.884-895.2005>
- Dent S., Neuman B.W. Purification of coronavirus virions for Cryo-EM and proteomic analysis. *Methods Mol. Biol.* 2015; 1282: 99-108. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_10
- Gralinski L.E., Baric R.S. Molecular pathology of emerging coronavirus infections. *J. Pathol.* 2015; 235(2): 185-95. DOI: <http://doi.org/10.1002/path.4454>
- Poland A.M., Vennema H., Foley J.E., Pedersen N.C. Two related strains of feline infectious peritonitis virus isolated from immunocompromised cats infected with a feline enteric coronavirus. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(12): 3180-4.
- Woo P.C., Lau S.K., Huang Y., Yuen K.Y. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 2009; 234(10): 1117-27. DOI: <http://doi.org/10.3181/0903-MR-94/>
- Lu S., Wang Y., Chen Y., Wu B., Qin K., Zhao J., et al. Discovery of a novel canine respiratory coronavirus support genetic recombination among betacoronavirus1. *Virus Res.* 2017; 237: 7-13. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.05.006>
- Poon L.L.M., Chu D.K.W., Chan K.H., Wong O.K., Ellis T.M., Leung Y.H.C., et al. Identification of a novel coronavirus in bats. *J. Virol.* 2005; 79(4): 2001-9. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.79.4.2001-2009.2005>
- Luk H.K.H., Li X., Fung J., Lau S.K.P., Woo P.C.Y. Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of SARS coronavirus. *Infect. Genet. Evol.* 2019; 71: 21-30. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.meeid.2019.03.001>
- Abdel-Moneim A.S. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): evidence and speculations. *Arch. Virol.* 2014; 159(7): 1575-84. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00705-014-1995-5>
- Andersen K.G., Rambaut A., Lipkin W.I., Holmes E.C., Garry R.F. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat. Med.* 2020; 26(4): 450-2. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>
- Corman V.M., Muth D., Niemeyer D., Drosten C. Hosts and sources of endemic human coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 2018; 100: 163-88. DOI: <http://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.01.001>
- Ye Z.W., Yuan S., Yuen K.S., Fung S.Y., Chan C.P., Jin D.Y. Zoonotic origins of human coronaviruses. *Int. J. Biol. Sci.* 2020; 16(10): 1686-97. DOI: <http://doi.org/10.7150/ijbs.45472>
- Wertheim J.O., Chu D.K., Peiris J.S., Kosakovsky P.S., Poon L.L. A case for the ancient origin of coronaviruses. *J. Virol.* 2013; 87(12): 7039-45. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.03273-12>
- Jevšnik M., Uršič T., Zigon N., Lusa L., Krivec U., Petrovec M. Coronavirus infections in hospitalized pediatric patients with acute respiratory tract disease. *BMC Infect. Dis.* 2012; 12: 365. DOI: <http://doi.org/10.1186/1471-2334-12-365>

22. Varghese L., Zachariah P., Vargas C., LaRussa P., Demmer R.T., Furuya Y.E., et al. Epidemiology and clinical features of human coronaviruses in the pediatric population. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.* 2018; 7(2): 151-8. DOI: <http://doi.org/10.1093/jpids/pix027>
23. Monto A.S., Cowling B.J., Peiris J.S.M. Coronaviruses. In: Kaslow R.A., Stanberry L.R., Le Duc J.W., eds. *Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control*. Boston, MA: Springer US; 2014: 199-223. DOI: http://doi.org/10.1007/978-1-4899-7448-8_10
24. Dominguez S.R., Robinson C.C., Holmes K.V. Detection of four human coronaviruses in respiratory infections in children: a one-year study in Colorado. *J. Med. Virol.* 2009; 81(9): 1597-604. DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.21541>
25. Jevšnik M., Steyer A., Pokorn M., Mrvič T., Grosek Š., Strle F., et al. The role of human coronaviruses in children hospitalized for acute bronchiolitis, acute gastroenteritis, and febrile seizures: a 2-year prospective study. *PLoS One.* 2016; 11(5): e0155555. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0155555>
26. Vabret A., Dina J., Gouarin S., Petitjean J., Tripey V., Brouard J., et al. Human (non-severe acute respiratory syndrome) coronavirus infections in hospitalised children in France. *J. Paediatr. Child Health.* 2008; 44(4): 176-81. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1440-1754.2007.01246.x>
27. Friedman N., Alter H., Hindiyeh M., Mendelson E., Shemer Avni Y., Mandelboim M. Human coronavirus infections in Israel: epidemiology, clinical symptoms and summer seasonality of HCoV-HKU1. *Viruses.* 2018; 10(10): 515. DOI: <http://doi.org/10.3390/v10100515>
28. Яцышина С.Б., Спичак Т.В., Ким С.С., Воробьева Д.А., Агеева М.Р., Горелов А.В. и др. Выявление респираторных вирусов и атипичных бактерий у больных пневмонией и здоровых детей за десятилетний период наблюдения. *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского.* 2016; 95(2): 43-50.
29. Sauro J., Lewis J. Estimating completion rates from small samples using binomial confidence intervals: comparisons and recommendations. *Proc. Hum. Factors Ergon. Soc. Annu. Meet.* 2005; 49(24): 2100-3. DOI: <http://doi.org/10.1177/154193120504902407>
30. Heimdal I., Moe N., Krokstad S., Christensen A., Skanke L.H., Nordbø S.A., et al. Human coronavirus in hospitalized children with respiratory tract infections: a 9-year population-based study from Norway. *J. Infect. Dis.* 2019; 219(8): 1198-206. DOI: <http://doi.org/10.1093/infdis/jiy646>
31. Chiu S.S., Chan K.H., Chu K.W., Kwan S.W., Guan Y., Poon L.L.M., et al. Human coronavirus NL63 infection and other coronavirus infections in children hospitalized with acute respiratory disease in Hong Kong, China. *Clin. Infect. Dis.* 2005; 40(12): 1721-9. DOI: <http://doi.org/10.1086/430301>
32. Li Y., Reeves R.M., Wang X., Bassat Q., Brooks W.A., Cohen C., et al. Global patterns in monthly activity of influenza virus, respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and metapneumovirus: a systematic analysis. *Lancet Glob. Health.* 2019; 7(8): e1031-45. DOI: [http://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30264-5](http://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30264-5)
33. Biggs H.M., Killerby M.E., Haynes A.K., Dahl R.M., Gerber S.I., Watson J.T. Human coronavirus circulation in the USA, 2014 – 2017. *Open. Forum Infect. Dis.* 2017; 4(Suppl. 1): S311-2. DOI: <http://doi.org/10.1093/ofid/ofx163.727>
34. Gorse G.J., Patel G.B., Vitale J.N., O'Connor T.Z. Prevalence of antibodies to four human coronaviruses is lower in nasal secretions than in serum. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010; 17(12): 1875-80. DOI: <http://doi.org/10.1128/01.00278-10>
35. Chan C.M., Tse H., Wong S.S.Y., Woo P.C.Y., Lau S.K.P., Chen L., et al. Examination of seroprevalence of coronavirus HKU1 infection with S protein-based ELISA and neutralization assay against viral spike pseudotyped virus. *J. Clin. Virol.* 2009; 45(1): 54-60. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.02.011>
36. McIntosh K., Dees J.H., Becker W.B., Kapikian A.Z., Chanock R.M. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1967; 57(4): 933-40. DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.57.4.933>
2. Cabeça T.K., Granato C., Bellei N. Epidemiological and clinical features of human coronavirus infections among different subsets of patients. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2013; 7(6): 1040-7. DOI: <http://doi.org/10.1111/irv.12101>
3. Bradburne A.F., Bynoe M.L., Tyrrell D.A. Effects of a "new" human respiratory virus in volunteers. *Br. Med. J.* 1967; 3(5568): 767-9. DOI: <http://doi.org/10.1136/bmj.3.5568.767>
4. Esposito S., Bosis S., Niesters H.G.M., Tremolati E., Begliatti E., Rognoni A., et al. Impact of human coronavirus infections in otherwise healthy children who attended an emergency department. *J. Med. Virol.* 2006; 78(12): 1609-15. DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.20745>
5. Dare R.K., Fry A.M., Chittaganpitch M., Sawanpanyalert P., Olsen S.J., Erdman D.D. Human coronavirus infections in rural Thailand: a comprehensive study using real-time reverse-transcription polymerase chain reaction assays. *J. Infect. Dis.* 2007; 196(9): 1321-8. DOI: <http://doi.org/10.1086/521308>
6. Nikolaeva S.V., Zvereva Z.A., Kanner E.V., Yatsyshina S.B., Usenko D.V., Gorelov A.V. A clinical-laboratory characteristic of coronavirus infection in children. *Infektsionnye bolezni.* 2018; 16(1): 35-9. DOI: <http://doi.org/10.20953/1729-9225-2018-1-35-39> (in Russian)
7. Gaunt E.R., Hardie A., Claas E.C.J., Simmonds P., Templeton K.E. Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR method. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(8): 2940-7. DOI: <http://doi.org/10.1128/JCM.00636-10>
8. Woo P.C.Y., Lau S.K.P., Chu C., Chan K., Tsoi H., Huang Y., et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J. Virol.* 2005; 79(2): 884-95. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.79.2.884-895.2005>
9. Dent S., Neuman B.W. Purification of coronavirus virions for Cryo-EM and proteomic analysis. *Methods Mol. Biol.* 2015; 1282: 99-108. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_10
10. Gralinski L.E., Baric R.S. Molecular pathology of emerging coronavirus infections. *J. Pathol.* 2015; 235(2): 185-95. DOI: <http://doi.org/10.1002/path.4454>
11. Poland A.M., Vennema H., Foley J.E., Pedersen N.C. Two related strains of feline infectious peritonitis virus isolated from immunocompromised cats infected with a feline enteric coronavirus. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(12): 3180-4.
12. Woo P.C., Lau S.K., Huang Y., Yuen K.Y. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp. Biol. Med. (Maywood).* 2009; 234(10): 1117-27. DOI: <http://doi.org/10.3181/0903-MR-94>
13. Lu S., Wang Y., Chen Y., Wu B., Qin K., Zhao J., et al. Discovery of a novel canine respiratory coronavirus support genetic recombination among betacoronavirus1. *Virus Res.* 2017; 237: 7-13. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.05.006>
14. Poon L.L.M., Chu D.K.W., Chan K.H., Wong O.K., Ellis T.M., Leung Y.H.C., et al. Identification of a novel coronavirus in bats. *J. Virol.* 2005; 79(4): 2001-9. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.79.4.2001-2009.2005>
15. Luk H.K.H., Li X., Fung J., Lau S.K.P., Woo P.C.Y. Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of SARS coronavirus. *Infect. Genet. Evol.* 2019; 71: 21-30. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.03.001>
16. Abdel-Moneim A.S. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): evidence and speculations. *Arch. Virol.* 2014; 159(7): 1575-84. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00705-014-1995-5>
17. Andersen K.G., Rambaut A., Lipkin W.I., Holmes E.C., Garry R.F. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat. Med.* 2020; 26(4): 450-2. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>
18. Corman V.M., Muth D., Niemeyer D., Drosten C. Hosts and sources of endemic human coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 2018; 100: 163-88. DOI: <http://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.01.001>
19. Ye Z.W., Yuan S., Yuen K.S., Fung S.Y., Chan C.P., Jin D.Y. Zoonotic origins of human coronaviruses. *Int. J. Biol. Sci.* 2020; 16(10): 1686-97. DOI: <http://doi.org/10.7150/ijbs.45472>
20. Wertheim J.O., Chu D.K., Peiris J.S., Kosakovsky P.S., Poon L.L. A case for the ancient origin of coronaviruses. *J. Virol.* 2013; 87(12): 7039-45. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.03273-12>
21. Jevšnik M., Uršič T., Zigon N., Lusa L., Krivec U., Petrovec M. Coronavirus infections in hospitalized pediatric patients with acute respiratory tract disease. *BMC Infect. Dis.* 2012; 12: 365. DOI: <http://doi.org/10.1186/1471-2334-12-365>

REFERENCES

1. de Groot R.J., Baker S.C., Baric R., Enjuanes L., Gorbalenya A.E., Holmes K.V., et al. Family Coronaviridae. In: King A.M., Lefkowitz E., Adams M.J., Carstens E.B. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London, San Diego: Elsevier Academic Press; 2011.

22. Varghese L., Zachariah P., Vargas C., LaRussa P., Demmer R.T., Furuya Y.E., et al. Epidemiology and clinical features of human coronaviruses in the pediatric population. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.* 2018; 7(2): 151-8. DOI: <http://doi.org/10.1093/jpids/pix027>
23. Monto A.S., Cowling B.J., Peiris J.S.M. Coronaviruses. In: Kaslow R.A., Stanberry L.R., Le Duc J.W., eds. *Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control*. Boston, MA: Springer US; 2014: 199-223. DOI: http://doi.org/10.1007/978-1-4899-7448-8_10
24. Dominguez S.R., Robinson C.C., Holmes K.V. Detection of four human coronaviruses in respiratory infections in children: a one-year study in Colorado. *J. Med. Virol.* 2009; 81(9): 1597-604. DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.21541>
25. Jevšnik M., Steyer A., Pokorn M., Mrvič T., Grosek Š., Strle F., et al. The role of human coronaviruses in children hospitalized for acute bronchiolitis, acute gastroenteritis, and febrile seizures: a 2-year prospective study. *PLoS One*. 2016; 11(5): e0155555. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0155555>
26. Vabret A., Dina J., Gouarin S., Petitjean J., Tripey V., Brouard J., et al. Human (non-severe acute respiratory syndrome) coronavirus infections in hospitalised children in France. *J. Paediatr. Child Health*. 2008; 44(4): 176-81. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1440-1754.2007.01246.x>
27. Friedman N., Alter H., Hindiyeh M., Mendelson E., Shemer Avni Y., Mandelboim M. Human coronavirus infections in Israel: epidemiology, clinical symptoms and summer seasonality of HCoV-HKU1. *Viruses*. 2018; 10(10): 515. DOI: <http://doi.org/10.3390/v10100515>
28. Yatsyshina S.B., Spichak T.V., Kim S.S., Vorob'eva D.A., Ageeva M.R., Gorelov A.V., et al. Revealing of respiratory viruses and atypical bacteria in children with pneumonia and healthy children for ten years of observation. *Pediatrics. Zhurnal im. G.N. Speranskogo*. 2016; 95(2): 43-50. (in Russian)
29. Sauro J., Lewis J. Estimating completion rates from small samples using binomial confidence intervals: comparisons and recommendations. *Proc. Hum. Factors Ergon. Soc. Annu. Meet.* 2005; 49(24): 2100-3. DOI: <http://doi.org/10.1177/154193120504902407>
30. Heimdal I., Moe N., Krokstad S., Christensen A., Skanke L.H., Nordbø S.A., et al. Human coronavirus in hospitalized children with respiratory tract infections: a 9-year population-based study from Norway. *J. Infect. Dis.* 2019; 219(8): 1198-206. DOI: <http://doi.org/10.1093/infdis/jiy646>
31. Chiu S.S., Chan K.H., Chu K.W., Kwan S.W., Guan Y., Poon L.L.M., et al. Human coronavirus NL63 infection and other coronavirus infections in children hospitalized with acute respiratory disease in Hong Kong, China. *Clin. Infect. Dis.* 2005; 40(12): 1721-9. DOI: <http://doi.org/10.1086/430301>
32. Li Y., Reeves R.M., Wang X., Bassat Q., Brooks W.A., Cohen C., et al. Global patterns in monthly activity of influenza virus, respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and metapneumovirus: a systematic analysis. *Lancet Glob. Health*. 2019; 7(8): e1031-45. DOI: [http://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30264-5](http://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30264-5)
33. Biggs H.M., Killerby M.E., Haynes A.K., Dahl R.M., Gerber S.I., Watson J.T. Human coronavirus circulation in the USA, 2014 – 2017. *Open. Forum Infect. Dis.* 2017; 4(Suppl. 1): S311-2. DOI: <http://doi.org/10.1093/ofid/ofx163.727>
34. Gorse G.J., Patel G.B., Vitale J.N., O'Connor T.Z. Prevalence of antibodies to four human coronaviruses is lower in nasal secretions than in serum. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010; 17(12): 1875-80. DOI: <http://doi.org/10.1128/CVI.00278-10>
35. Chan C.M., Tse H., Wong S.S.Y., Woo P.C.Y., Lau S.K.P., Chen L., et al. Examination of seroprevalence of coronavirus HKU1 infection with S protein-based ELISA and neutralization assay against viral spike pseudotyped virus. *J. Clin. Virol.* 2009; 45(1): 54-60. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.02.011>
36. McIntosh K., Dees J.H., Becker W.B., Kapikian A.Z., Chanock R.M. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1967; 57(4): 933-40. DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.57.4.933>