

Edyta Abramczuk^{*1}, Katarzyna Pancer¹, Włodzimierz Gut¹, Bogumiła Litwińska¹

¹Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny

Wpłynęło w październiku 2016 r.
Zaakceptowano w styczniu 2017 r.

1. Historia. 2. Taksonomia i występowanie. 3. Struktura i namnażanie się koronawirusów. 4. Receptory komórkowe wykorzystywane przez koronawirusy człowieka. 5. Zakażenie człowieka – transmisja, objawy, charakterystyka. 6. Diagnostyka. 7. Podsumowanie

Non-pandemic human coronaviruses – characteristics and diagnostics

Abstract: In this article, the characteristics of human coronaviruses (HCoV) are presented. Currently, six human coronaviruses are known: HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, HCoV-SARS and HCoV-MERS. The first human coronaviruses were described in the sixties of the twentieth century, the last one, HCoV-MERS, in 2012 y. Coronaviruses can cause mild, asymptomatic infections as well as severe respiratory diseases, like pneumonia and bronchiolitis. The symptoms of HCoV infection are mainly: fever, nasopharyngitis, cough, bronchiolitis, pneumonia. Infections due to HCoV occur during the whole human life, but are most frequent in children. They can occur throughout the year, but are most common in the winter season. Treatment of HCoV infections is usually symptomatic. Diagnosis of HCoV is mainly based on molecular techniques such as quantitative PCR. Serological tests are only used for epidemiological purposes.

1. History. 2. Taxonomy and occurrence. 3. The structure and amplification of human coronaviruses. 4. Cell receptors used by human coronaviruses. 5. Human infection – transmission, symptoms, characteristics. 6. Diagnostics. 7. Summary

Słowa kluczowe: koinfekcje wirusowe, koronawirusy człowieka

Key words: viral co-infections, human coronaviruses

1. Historia

Koronawirusy (*Coronavirus*; HCoV) wywołują zakażenia na całym świecie zarówno u ludzi, jak też u zwierząt. Koronawirusy człowieka (*Human Coronavirus*; HCoV) znane są przede wszystkim jako czynniki etiologiczne zakażeń dolnych i górnych dróg oddechowych, mogą wywołać również objawy ze strony układu pokarmowego (zapalenie żołądka i jelit) oraz nerwowego [50]. Obecnie znanych jest 6 koronawirusów zakażających człowieka: HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, HCoV-SARS oraz HCoV-MERS, w tym 4 ostatnie opisane w XXI wieku. Wraz z rozwojem technik laboratoryjnych zmieniały się metody wykrywania koronawirusów. Koronawirusy HCoV-229E oraz HCoV-OC43 zostały po raz pierwszy opisane w połowie lat 60 XX wieku, odpowiednio w 1966 r. i 1967 r., u osób z objawami przeziębienia. Główną metodą identyfikacji wirusów było wówczas namnażanie na liniach komórkowych oraz różnicowanie antygenowe i/lub w mikroskopie elektronowym [49]. Uważano wtedy, że jedynie te dwa koronawirusy są chorobotwórcze dla człowieka. Dopiero po 40 latach, w roku 2003, zidentyfikowano kolejnego koronawirusa wywołującego zakażenia u ludzi – SARS-CoV. Wirus ten jest czynnikiem etiologicznym zespołu ostrej niewydolności oddechowej (severe acute respiratory

syndrome) i w latach 2002–2003 wywołał zakażenia u ponad 8 tys. osób, głównie w Azji. W czasie tej epidemii ponad 700 przypadków zakażeń zakończyło się zgonem. W latach 2004 i 2005, dzięki zastosowaniu nowoczesnych metod biologii molekularnej, zidentyfikowano kolejne koronawirusy patogenne dla człowieka, odpowiednio, HCoV-NL63 i HCoV-HKU1. Pierwszy przypadek zakażenia wywołanego przez HCoV-NL63 opisano w Holandii u dziecka z zapaleniem oskrzelików płucnych, natomiast HCoV-HKU1 wykryto w Hong Kongu, u osoby dorosłej z zapaleniem płuc. Cztery lata temu, w 2012 r., zidentyfikowano kolejnego, groźnego dla ludzi, koronawirusa – HCoV-MERS [16, 26, 40], który jest czynnikiem epidemicznych zakażeń na Bliskim Wschodzie. Są to zakażenia o różnym przebiegu, począwszy od asymptomatycznych do ARDS (acute respiratory distress syndrome). Epidemia do chwili obecnej nie została wygaszona [43, 51].

Koronawirusy SARS i MERS zaliczane są do wirusów o potencjale pandemicznym, których identyfikacja wymaga zgłoszenia zakażenia do WHO. Natomiast pozostałe 4 koronawirusy wiązane są przede wszystkim z zakażeniami dróg oddechowych o lekkim lub niezbyt ciężkim przebiegu. Niektórzy autorzy szacują, że nawet 20–30% łagodnych zakażeń górnych dróg oddechowych, szczególnie u dorosłych oraz u starszych dzieci, jest wywoływana przez te koronawirusy [13]. Natomiast

* Autor korespondencyjny: Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa; tel/fax + 48 22 542 13 85; e-mail: eabramczuk@pzh.gov.pl

jako czynnik etiologiczny zakażeń dróg oddechowych wymagających hospitalizacji stwierdza się je w ok. 3–15% przypadków [9, 19, 32]. Dane epidemiologiczne, analizy objawów oraz częstości występowania koronawirusów są ograniczone, ale w związku z pojawieniem się w 2012 r. nowego koronawirusa o potencjale pandemicznym liczba badań obejmujących także pozostałe HCoV stale wzrasta.

2. Taksonomia i występowanie

Koronawirusy należą do rzędu *Nidovirales*, rodziny *Coronaviridae*, podrodziny *Coronavirinae*. Wyróżniono 4 rodzaje: *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* oraz ostatnio wyróżnione *Deltacoronavirus* [13] (Rys.1). W obrębie poszczególnych rodzajów (czasem zwanych grupami) wyodrębnionych na podstawie różnic genetycznych oraz zdolności wykorzystywania receptorów komórkowych, wyróżniono jeszcze podgrupy np. w obrębie betakoronawirusów wyróżnia się podgrupy (linie) A, B, C i D.

Koronawirusy stanowią liczną grupę wirusów zdolnych do zakażenia różnych gatunków zwierząt. Do tej

- Rząd: *Nidovirales*
 Rodzina: *Coronaviridae*
 Podrodzina: *Coronavirinae*
 Rodzaj: *Alfacoronavirus*
 Gatunek: **HCoV-NL63**; **HCoV-229E**; HKU2;
 HKU8; TGEV; FIPV, PEDV;
 Rodzaj: *Betacoronavirus*
 Linia A
 Gatunek: **HCoV-OC43**; **HCoV-HKU1**; MHV;
 Linia B
 Gatunek: **HCoV-SARS**;
 Linia C
 Gatunek: **HCoV-MERS**; HKU4; HKU5;
 Linia D
 Gatunek: HKU9;
 Rodzaj: *Deltacoronavirus*
 Gatunek: HKU11, HKU12, HKU13;
 Rodzaj: *Gammacoronavirus*
 Gatunek: IBV; TuCoV

Rys. 1. Systematyka koronawirusów

Wytłuszczonym drukiem – patogeny człowieka. Objaśnienia skrótów: PEDV – *Porcine epidemic diarrhea virus*; TGEV – *Transmissible Gastroenteritis Coronavirus*; FCoV – *Feline coronavirus*; MHV – *Mouse hepatitis virus*; FIPV – *Feline Infectious Peritonitis Virus (FCoV)*; HKU1 – *HongKong coronavirus 1*; IBV – *Infectious Bronchitis Virus (kury)*; TuCoV – *turkey coronavirus*; MERS – *Middle East Respiratory Syndrom coronavirus*; SARS – *Severe Acute Respiratory Syndrom coronavirus*.

pory opisywano zachorowania wywołane przez koronawirusy u ptaków, kotów, psów, świń, myszy, koni, wielorybów, wielbłądów oraz nietoperzy [54]. Najwięcej gatunków koronawirusów wywołujących zachorowania opisano dla człowieka (6 wirusów), świni (5) oraz nietoperzy (różne gatunki). Koronawirusy należące do

gamma- i deltakoronawirusów wykrywane są głównie u ptaków [26]. Zachorowania u ludzi wywołane są przez alfa- i betakoronawirusy. Spośród alfakoronawirusów są to: *HCoV-229E* i *HCoV-NL63*. Na podstawie wykazanej homologii sekwencji poszczególnych genów pomiędzy tymi wirusami stwierdzono, że prawdopodobnie *HCoV-NL63* wywodzi się od *HCoV-229E* [26, 45]. Natomiast spośród koronawirusów należących do betakoronawirusów zachorowania u ludzi powodują: *HCoV-OC43*, *HCoV-HKU1* oraz *HCoV-SARS* i *HCoV-MERS*. Wirusy *HCoV-HKU1* i *HCoV-OC43* klasyfikowane są do linii A betakoronawirusów, a *HCoV-SARS* do linii B. Koronawirus MERS jest pierwszym opisanym patogenem człowieka należącym do linii C z rodzaju betakoronawirusów, do której zalicza się także, wykrywane u nietoperzy, HKU4 i HKU5. Linia D w rodzaju betakoronawirus nie obejmuje organizmów uznawanych za patogenne dla człowieka (np. *CoV-HKU9* występuje jedynie u nietoperzy) [50, 54].

Do niedawna sądzono, że poszczególne koronawirusy zakażają jedynie jeden gatunek gospodarza lub ewentualnie blisko spokrewnione gatunki. Nazwy poszczególnych gatunków koronawirusów wskazywałyby na ich dość wysoką swoistość gatunkową oraz wywoływanych podstawowych objawów lub atakowanych narządów – np. *PEDV* oznacza koronawirusa wywołującego biegunki u świni zaś *FIPV* – koronawirusa kotów wywołującego zapalenie otrzewnej itp. Należy zauważyć, że w warunkach eksperymentalnych, koronawirusy wywołujące zachorowania u jednych gatunków mogą namnażać się także w organizmach innych gospodarzy, np. koronawirus psa (*CCoV*) oraz koronawirus kota (*FCoV*) mogą namnażać się w organizmie świni i powodować zmiany kliniczne, takie jak w przebiegu zakażenia *TGEV* czyli koronawirusa powodującego zapalenie żołądka i jelit świni [6].

Problem transmisji koronawirusa z jednego na drugiego gospodarza jest szczególnie istotny w aspekcie pojawiania się nowych wirusów patogennych dla człowieka. Ważnym rezerwuarem koronawirusów są przede wszystkim nietoperze, które były pierwotnym rezerwuarem *HCoV-SARS* i *HCoV-MERS* wywołujących epidemie. Obecnie uważa się, że prawdopodobnie pierwszym gospodarzem wszystkich koronawirusów były nietoperze [25, 50, 54].

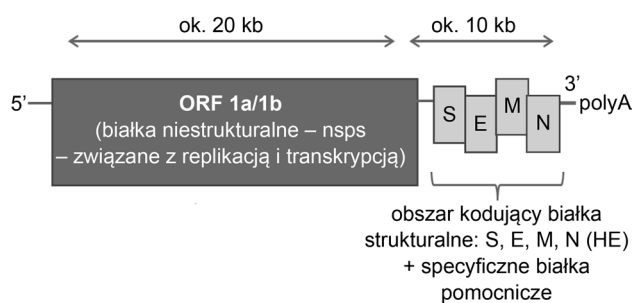
Wirus SARS jest chorobotwórczy dla ludzi i zwierząt, w tym małp, psów, kotów, szczurów. Rezerwuarem *HCoV-SARS* były początkowo nietoperze, od których ulegały zakażeniu cywety palmowe (*łuskuny palmowe*, *palm civet*), które stanowią przysmak kuchni chińskiej. W wyniku bliskiego kontaktu tych zwierząt z ludźmi, *HCoV-SARS* został przeniesiony na populację ludzką. Po opanowaniu epidemii *HCoV-SARS*, począwszy od 2005 r., wirusy te nie są izolowane od chorych z wyjątkiem zakażeń nabytych w laboratorium [26].

Wirus MERS po raz pierwszy został opisany w 2012 r. jako czynnik ciężkich i zagrażających życiu chorego zakażeń dolnych dróg oddechowych. Zakażenia te w ponad 85% obserwowane są w u osób zamieszkujących lub odwiedzających kraje Półwyspu Arabskiego (gł. Arabia Saudyjska) lub mające kontakt z osobami z tego regionu. Śmiertelność w zakażeniu *MERS-CoV* wynosi średnio 36%, ale znacznie częściej zachorowanie kończy się zgonem u osób w wieku powyżej 60 r.ż. W przypadku koronawirusa MERS pośrednim gospodarzem są wielbłądy. Badania sero-epidemiczne wykazały, że wirus podobny do MERS od lat powoduje zakażenia i zachorowania wielbłądów szczególnie na Półwyspie Arabskim i w Afryce. Obecnie, zachorowania koronawirusem MERS u ludzi są nadal obserwowane, ale ich liczba jest znacznie niższa niż na początku epidemii [51].

3. Struktura i namnażanie się koronawirusów

W mikroskopie elektronowym wirusy te, dzięki obecności charakterystycznych struktur białkowych w postaci powierzchniowych wypustek wystających z dwuwarstwowej osłonki lipidowej, przypominają kształtem koronę. Stąd ich nazwa – koronawirusy [26]. Ich średnica waha się od 60 do 220 nm. Nukleokapsyd koronawirusów pokryty jest dwuwarstwową osłonką, w skład której oprócz lipidów wchodzi również białka: osłonkowe (E), membranowe zwane również matriksem (M), które jest transbłonową glikoproteiną oraz glikoproteinowe wypustki. Genom koronawirusów (+ssRNA), o wielkości ok. 25–32 kb, wraz z białkiem nukleoproteiny (N) tworzy rybonukleoproteinę zwinętą w ciasny heliks. Koronawirusy posiadają jeden z największych genomów spośród wirusów RNA, co w połączeniu z wysoką zmiennością charakterystyczną dla wirusów RNA prowadzi do kumulacji zmian sekwencji genomu, czego efektem może być powstawanie różnych wariantów wirusów oraz zmiana tropizmu komórkowego [49].

Wszystkie koronawirusy charakteryzuje podobna organizacja genomu (Rys. 2). Na końcu 5' znajduje się czapeczka, natomiast na końcu 3' – łańcuch poliA. W genomie zawarta jest informacja genetyczna dla 15–16 białek niestrukturalnych (nsps) potrzebnych do replikacji, 4–5 białek strukturalnych oraz 1–8 białek tzw. „pomocniczych” [39, 47]. W genomie koronawirusów występuje 6 otwartych ramek odczytu (ORFs) [5]. Pierwsza z nich, począwszy od końca 5', ORF1a/b obejmuje ok. 2/3 genomu i koduje tzw. „geny replikazy” czyli 15–16 białek niestrukturalnych biorących udział w replikacji wirusów. Pozostała 1/3 genomu od końca 3' stanowi obszar kodujący tzw. białka strukturalne: (S) – glikoproteina powierzchniowa, (E) – małe białko osłonkowe, (M) – białko membranowe oraz



Rys. 2. Schemat organizacji genomu koronawirusów

ORF 1a/1b – otwarta ramka odczytu kodująca niestrukturalne białka związane z replikacją i transkrypcją; białka strukturalne: S (glikoproteina powierzchniowa), E (osłonkowe), M (białko membranowe), N (białko nukleokapsydu); HE – u niektórych betakoronawirusów występuje białko HE czyli Hemaglutynina-Esteraza [47].

białko nukleokapsydu – (N). W przypadku niektórych koronawirusów (np. *HCoV-SARS*) pomiędzy ORF1b a genem kodującym glikoproteinę powierzchniową znajduje się fragment kodujący białko HE (hemaglutynina-esteraza) [39].

Za wiązanie cząstek wirusa do poszczególnych receptorów na błonie komórek gospodarza, fuzję z błoną pęcherzyków endocytarnych, jak też wniknięcie wirusa do komórek gospodarza odpowiada białko S i ew. HE [33]. Badania nad poznaniem mechanizmów wnikania różnych koronawirusów do komórek trwają, ale uznaje się, że podstawowym jest endocytoza. Po fuzji osłonki wirusa z błoną endosomu wirus jest uwalniany do cytoplazmy. Mechanizm tego procesu może być różny, w zależności od gatunku wirusa. Wykazano, że w przypadku *HCoV-SARS* i *HCoV-229E* fuzja jest zależna od niskiego pH, natomiast nie zaobserwowano takiej zależności dla *HCoV-NL63* [40]. W procesie fuzji prawdopodobnie bierze udział białko S i N. Białko N jest nukleoproteiną, ściśle związaną z procesem uwalniania wirusowego RNA i tworzeniem nukleokapsydu.

Genom koronawirusów w związku z tym, że jest to pojedyncza nić RNA o dodatniej polarności i posiadająca czapeczkę, ma właściwości zakaźne. Nić +ssRNA pełni funkcję zarówno mRNA jak i genomowego RNA, które jest przepisywane na nić komplementarną stanowiącą podstawę syntezy nowych cząstek genomowych oraz syntezy nowych mRNA. Po uwolnieniu +ssRNA do cytoplazmy następuje synteza polipeptyny replikazy na bazie ORF 1a/b oraz jej cięcie i powstają białka niestrukturalne biorące udział w replikacji. Miejszem replikacji koronawirusów są pęcherzyki utworzone z błon retikulum endoplazmatycznego (DMVs). W powstawaniu tych pęcherzyków biorą udział niestrukturalne białka wirusowe (np. nsp3, nsp4, nsp6). W procesie replikacji koronawirusów powstaje dwuniciowe RNA (dsRNA), które musi być chronione przed komórkowymi mechanizmami obronnymi, zanim zostanie przepisane na genomowe RNA (+ssRNA) lub mRNA.

Nowosyntezy RNA może zostać wykorzystane do replikacji lub translacji. Następnie następuje synteza białek strukturalnych (S, E, M, N, HE) z subgenomowego RNA [39, 40, 47], które dalej uczestniczą w składaniu wirusów potomnych, te zaś za pośrednictwem egzocytozy uwalniane są z komórki [52].

4. Receptory komórkowe wykorzystywane przez koronawirusy człowieka

Poszczególne koronawirusy wykorzystują różne receptory komórkowe, co zostało wykorzystane przy podziale na 3 grupy – w zależności od tego, jaki receptor jest przez nie rozpoznawany. Przykładowo, *HCoV-229E* (grupa 1) – wykorzystuje aminopeptydazę N (APN, CD13), *SARS-CoV* oraz *HCoV-NL63* (grupa 2) – ludzką konwertazę angiotensyny2 (hACE2), natomiast *HCoV-MERS* (grupa 2c) – dipeptydylopeptydazę 4 (DPP4). Wykazanie zdolności do rozpoznawania poszczególnych receptorów komórkowych nie jest jednoznaczne z określeniem patogennych właściwości badanego wirusa. Stwierdzono, iż powinowactwo białka S wirusa NL63 do hACE2 jest mniejsze niż w przypadku białka S wirusa SARS, co mogłoby tłumaczyć różnice w przebiegu zachorowań w wyniku zakażeń tymi wirusami [15, 26, 39, 40, 45, 49, 53]. Różnice w powinowactwie białka S do hACE2 mogą wynikać z różnic w strukturze I oraz II rzędowej. Nie należy zapominać, że receptory hACE2 są także rozpoznawane przez inne wirusy np. grypy ptaków H5N1. Wykazano zależność między obecnością tych receptorów a przebiegiem zachorowania ze strony układu oddechowego podczas zakażenia wirusem grypy ptaków H5N1. Receptory hACE2 znajdują się na komórkach w wielu tkankach człowieka, ale najsilniej ekspresja tych receptorów występuje w płucach oraz nerkach [52]. Podobieństwo *HCoV-MERS* do szczepów *CoV-HKU4* i *CoV-HKU5*, które dotychczas były izolowane jedynie od nietoperzy (odpowiednio od *Tyonycteris pachypus* i *Pipistrellus abramus*), pozwoliło na wyciągnięcie hipotezy, że nietoperze stanowią rezerwar również tego blisko spokrewnionego wirusa [54]. Co więcej, według badań przeprowadzonych przez Yang i wsp. (2015) tylko dwie mutacje w sekwencji białka S wystarczają, żeby *CoV-HKU4*, który obecnie jest uznawany za niechorobotwórczy dla ludzi, zyskał całkowitą zdolność zakażenia człowieka.

5. Zakażenia człowieka: transmisja, objawy, charakterystyka

Koronawirusy wywołujące zakażenia układu oddechowego u ludzi rozprzestrzeniają się głównie drogą kropelkową, ale również przez kontakt bezpośredni

z wydaliniami pochodzącymi od osób chorych (mocz, kał, wyciek z nosa) [13]. Stwierdzono zdolność wirusów do zachowania zakaźności na powierzchniach ceramicznych, szklanych oraz wykonanych z PVC, teflonu itp. nawet przez 4–5 dni, co sugeruje istotny udział szerzenia się zakażeń poprzez dotyk skażonych powierzchni [13].

Wśród zakażeń wywoływanych u ludzi przez koronawirusy należy wyróżnić *HCoV-SARS* oraz *HCoV-MERS*, które wywołują epidemie i przebieg choroby stanowi istotne zagrożenie dla zdrowia i życia chorych oraz koronawirusy *HCoV-OC43*, *HCoV-229E*, *HCoV-NL63* i *HCoV-HKU1* powodujące na ogół grypopodobne zakażenia, których częstość szacowana jest na ok. 15–20% i hospitalizacji wymaga od 2% do 10% chorych [26]. Jednak niekiedy stanowią przyczynę aż 30% potwierdzonych grypopodobnych zakażeń wirusowych [1, 46].

Objawy wywołane zakażeniem koronawirusami nie są charakterystyczne. Podwyższona temperatura ciała (pow. 37,5°C) występuje u 50–80% chorych. U dzieci obserwuje się zapalenie błony śluzowej nosa i gardła – u 10–20%, zapalenie ucha środkowego – u 15–30%, zapalenie spojówek – u 2–15%. W przypadku zakażeń dolnych dróg oddechowych u dzieci przede wszystkim obserwowane jest zapalenie oskrzeli, zapalenie płuc oraz zaostrzenie przebiegu astmy. Natomiast u hospitalizowanych osób dorosłych często występują ciężkie postaci zapalenia płuc oraz, podobnie jak u dzieci, zaostrzenie objawów POChP. U około 20–40% hospitalizowanych pacjentów (zarówno dzieci jak i dorosłych), u których wykazano zakażenie koronawirusami, stwierdzono objawy ze strony układu pokarmowego. U około 30% tych pacjentów stwierdzono także współistniejące zakażenie innym wirusem wywołującym nieżyt żołądka i jelit np. rotawirusem lub adenowirusem. Jednak objawy wyłącznie ze strony układu pokarmowego w przebiegu zakażeniami koronawirusami nie są częste [30, 48].

Zauważono, że objawy choroby mogą się różnić w zależności od gatunku wywołującego je wirusa. W przypadku zakażeń *HCoV-229E* dominują katar, przekrwienie śluzówek (congestion), niekiedy kaszel, ból gardła oraz ogólne osłabienie, co nie wymaga leczenia szpitalnego. Szacuje się, że ok. 30% zakażeń *HCoV-229E* przebiega bezobjawowo. W zakażeniach *HCoV-OC43* objawy są podobne, choć rzadziej występuje katar, a pacjenci częściej skarżą się z powodu kaszlu i świszczącego oddechu. Szacuje się, że ok. 20% zakażeń ma przebieg bezobjawowy. Chociaż nie stwierdzono różnic w przebiegu zakażeń wymagających hospitalizacji wywołanych przez *HCoV-229E* lub *HCoV-OC43* [48], to Gaunt i wsp. zaobserwowali związek między zachorowaniami wywołanymi przez *HCoV-229E* a stosowaną u chorego immunosupresją [21]. Natomiast zakażenia *HCoV-NL63* są dość często stwierdzane u małych dzieci, hospitalizowanych z powodu zapale-

nia oskrzeli lub krupę wirusowego. U dorosłych wirus ten może być także przyczyną zakażeń dolnych dróg oddechowych [20, 39, 48]. *HCoV-HKU1* wiązany jest przede wszystkim z zakażeniami górnych dróg oddechowych i zaostrzeniem przebiegu astmy. Wykrywano go w próbkach kału pobranych od chorych z problemami ze strony układu pokarmowego, głównie jelit, ale często w koinfekcji z innymi wirusami wywołującymi zakażenia pokarmowe [40, 48].

Najcięższy przebieg choroby obserwowany jest w zakażeniach wywoływanych przez *HCoV-SARS*. W początkach choroby są to objawy grypopodobne, często mylone z innym zakażeniem wirusowym, ale w końcowej fazie choroby *HCoV-SARS* u ok. 20% pacjentów powoduje zespół ciężkiej niewydolności oddechowej, ang. *Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)*, który może prowadzić do śmierci chorego [49]. Śmiertelność w przypadkach SARS wynosi ok. 10%. Natomiast w przebiegu ostrego zakażenia układu oddechowego wywołanego przez *HCoV-MERS* nie stwierdza się typowego dla zakażeń wirusowych 2-fazowego przebiegu choroby, jak również objawów charakterystycznych tylko dla tego wirusa. Ponadto zakażenia wirusem *HCoV-MERS* mogą czasem przebiegać łagodnie lub bezobjawowo, co stwarza trudności w postawieniu prawidłowej diagnozy wykluczającej możliwość zakażenia innymi wirusami (np. wirusem grypy). W takich przypadkach nieocenioną pomoc niesie wywiad epidemiologiczny, ponieważ zakażenia *HCoV-MERS* wiązane są z podróżami na Bliski Wschód lub kontaktem z osobą powracającą z tamtych terenów. Należy również pamiętać, że zakażenia *HCoV-MERS* występują często u osób z obniżoną odpornością i w związku z tym śmiertelność zakażeń u tych pacjentów jest dużo wyższa i wynosi od 30–60% [51].

Nishiura i wsp. (2012) uważają, że jednym z głównych czynników ułatwiających ustalenie podejrzenia o zakażenia koronawirusami jest określenie czasu inkubacji choroby. Wystąpienie objawów choroby w czasie krótszym bądź równym 2 dniom wskazuje na prawdopodobieństwo zakażenia wirusem grypy, z kolei inkubacja od 3 do 5 dni może być związana z zakażeniem ludzkimi koronawirusami [42]. Wyjątek stanowi *HCoV-SARS* i *HCoV-MERS*, dla których okres ten może wynosić nawet do 14 dni [48].

Zakażenia koronawirusami występują bez względu na płeć, wiek czy położenie geograficzne (Tab. I). Do pierwszych zakażeń człowieka dochodzi głównie we wczesnym dzieciństwie, a reinfekcje mogą występować w ciągu całego życia. Koronawirusy powodują zachorowania we wszystkich grupach wiekowych [20, 48]. Zaobserwowano jednak, iż *HCoV-229E* oraz *HCoV-HKU1* wywołują głównie zachorowania u dorosłych, natomiast *HCoV-OC43* i *HCoV-NL63* u dzieci, szczególnie poniżej 2 roku życia [1, 50].

Na świecie zakażenia koronawirusami obserwowane są przez cały rok, ale największą częstość tych zakażeń notuje się w miesiącach jesienno-zimowych lub podczas pory deszczowej. Jednak w Chinach koronawirusy wykrywane są najrzadziej podczas miesięcy jesiennych, a w Hong Kongu szczyt zachorowań *HCoV-NL63* przypada na okres wiosenno-letni [30]. W wielu krajach szczyt zachorowań wywołanych przez koronawirusy pokrywa się lub jest zbliżony do szczytu zakażeń wywołanych przez RSV i wirusy grypy [1, 48]. Badania dotyczące krążenia tych wirusów są nieliczne, ale w poszczególnych okresach zaobserwowano różną aktywność nie-epidemicznych koronawirusów. Badania te obejmowały na ogół konkretne grupy pacjentów i najczęściej byli to pacjenci hospitalizowani. Z tego powodu istnieją wątpliwości czy brak identyfikacji niektórych gatunków, *HCoV-229E* lub *-HKU1*, jako czynników etiologicznych ostrego zakażenia dróg oddechowych (ARI, acute respiratory infection) oznacza brak aktywności tych wirusów w danym regionie, czy też z powodu wywoływania głównie łagodnych zachorowań nie są one diagnozowane. Jednak należy wziąć pod uwagę, że w okresie jesienno-zimowym, kiedy koronawirusy oraz inne wirusy wywołujące zakażenia układu oddechowego, takie jak RSV, grypa, *HMPV* itp. są najczęściej wykrywane, a ich różnorodność jest najwyższa, to nadal nie wszystkie są identyfikowane. Innym problemem jest występowanie koronawirusów w zakażeniach mieszanych, co potwierdzają badania wielu zespołów i wskazują, że mogą być one jednym z najczęstszych czynników wywołujących współzakażenia z innymi wirusami. Szacuje się, że ok. 45–60% zakażeń wywołanych przez te wirusy dotyczy właśnie ko-inkubacji [26, 31]. W badaniach przeprowadzonych przez Hoe i wsp. (2007) zostało wykazane, że w przypadku współzakażenia liczba cząstek *HCoV-NL-63* jest zwykle niższa niż w przebiegu zakażenia pojedynczym wirusem. Współwystępujące zakażenia wirusowe stwierdzano przede wszystkim u osób hospitalizowanych [26], natomiast niewiele wiadomo o ewentualnych współzakażeniach wirusowych nie wymagających hospitalizacji. Najczęściej wykrywano mieszane zakażenia wywołane przez koronawirusy w połączeniu z zakażeniem RSV, *HMPV*, wirusami grypy lub enterowirusami czego powodem może być współwystępowanie tych wirusów w środowisku [Tab. I] [1].

6. Diagnostyka

Do 2002 r. diagnostyka zakażeń dróg oddechowych obejmująca koronawirusy prowadzona była jedynie przez nieliczne ośrodki. W związku z pojawieniem się nowego, epidemicznego gatunku *HCoV-SARS* zintensyfikowano badania nad tą rodziną wirusów. Po

Tabela I
Wybrane badania dotyczące częstości koronawirusów

Lata badań	Kraj/region	Wiek chorych (lata)	Liczba badanych	Rozpoznanie kliniczne	Ogółem zakażenie wirusowe (%)	Częstość HCoV (%)	Inne poszukiwane patogeny	Ref.
2001–02	Chiny/Hong Kong	0–18	587	ARI	36,3	4,4	RSV, HMPV, HPIV, Flu, HAdV	[8]
2003	Australia	0–18	1247	ARI	52,9	4,3	RSV, HRV, EV, HMPV, HPIV, Flu, HAdV, HBoV	[23]
2004	Australia	0–60	888	ARI	31,6	8,3	RSV, HRV, HMPV, HPIV, Flu, HAdV	[34]
2004–05	Francja	0–16	1002	ARI	bd	9,8	Ujemne w badaniu rutynowym: RSV, HRV/EV, HPIV, Flu, HAdV	[48]
2004–05	Włochy	18+	510	LRTI	42,2	3,3	RSV, HRV, HMPV, HPIV, Flu, HAdV	[37]
2003–06	Szwajcaria*	18+	299	ARI	17,4	5,6**	RSV, HRV, HMPV, HPIV, Flu, HBoV	[20]
2005–07	Chiny/Beijing	14+	5808	ARI	34,6	1,1	RSV, HRV, EV, HMPV, HPIV, Flu, HAdV	[44]
2007–08	Korea	0–5	296	ARI	50	5,5	RSV, HRV, HMPV, HPIV, Flu, HAdV, HBoV	[10]
2007–08	Słowenia	0–6	592	ARI	70,6	6	RSV, HPIV, Flu, HAdV	[28]
2006–09	Szkocja	0–80	7382	ARI	28,4	2,3	RSV, HPIV, Flu, HAdV	[21]
2008–09	Europa (INFLUENCE65 surv)	65+	556	ILI	57,6	10	RSV, HRV/ EV, HMPV, HPIV, Flu, HAdV, SARS	[18]
2010–11	Madagaskar	0–5	295	ARI	74,6	12,5	RSV, HRV, HMPV, HPIV	[27]
2010–12	Brazylia	19–80	134	URTI	32,1	0,75	RSV, HRV/EV, HMPV, HPIV, Flu, HAdV, HBoV	[14]
2011–12	Szwajcaria	0–18 0–18 18–65 18–65 65+ 65+	645 138 904 270 920 119	URTI LRTI URTI LRTI URTI LRTI	78,6 40,6 44,6 20,4 46 23,5	5 0 9 16 13 11	RSV, HRV/EV, HMPV, HPIV, Flu, HAdV	[3]
2011–12	Polska (armia)	18+	399	ILI	40	36	RSV, HRV/EV, HMPV, HPIV, Flu, HAdV, HBoV	[29]
2011–13	Hiszpania	0–14	204	LRTI	91,7	2,5	RSV, HRV, HMPV, HPIV, HAdV, HBoV	[7]
2013–14	Polska (badania własne)	0–16	370	ARI	51,4	25	RSV	[1]

* 80% badanych pacjentów było w immunosupresji

** wśród próbek dodatnich częstość wykrywania koronawirusów wynosiła 32%

Objaśnienia skrótów: RSV – Respiratory syncytial virus; HMPV – Human metapneumovirus, metapneumowirus człowieka; HPIV – Human parainfluenza viruses, wirus paragrypy człowieka; Flu – Influenza virus, wirus grypy; HAdV – human adenowirus, adenowirus człowieka, EV – enterovirus, enterowirus; HRV – Human rhinovirus, rinowirus człowieka, HBoV – Human bocavirus, bokawirus człowieka; Bd – brak danych, L/URTI – infekcje dolnych/ górnych dróg oddechowych, ARI – ostre zakażenie dróg oddechowych, ILI – choroba grypopodobna.

odkryciu *HCoV-NL63* oraz *HCoV-HKU1* zdecydowanie wzrosła liczba badań, ale dopiero pojawienie się w 2012 r. *HCoV-MERS* i zwiększająca się liczba przypadków śmiertelnych w wyniku zakażenia tym wirusem spowodowało uwzględnienie zakażeń koronawirusami w rutynowej diagnostyce. W badaniach diagnostycznych wykorzystywane są materiały pobrane z układu oddechowego (wymaz z gardła, wymaz z nosa, aspirat przetchnawiczy, BAL), próbki moczu i kału oraz surowicę krwi [49]. W celu zwiększenia czułości procesu

identyfikacji, np. w przypadku *HCoV-MERS*, zalecane jest pobieranie próbek z różnych odcinków układu oddechowego oraz w różnych okresach po wystąpieniu objawów choroby. W diagnostyce zakażeń koronawirusami stosowane są metody oparte na technikach biologii molekularnej, izolacji wirusa w hodowlach komórkowych oraz metody serologiczne [51].

Ze względu na trudności związane z izolacją koronawirusów w hodowlach komórkowych, techniki biologii molekularnej są metodami z wyboru. Naj-

Tabela II
Wybrane przykłady zastosowania metod biologii molekularnej do diagnostyki zakażeń koronawirusami

Metoda	Fragment	Genotyp	Uwagi	Ref.
Nested-PCR	Brak danych	Alfa- corona	Wykrywa m.in. HCoV-229E i HCoV-NL-63	[41]
	Brak danych	Beta- corona	Wykrywa m.in. OC43, HKU1, nie wykrywa MERS-CoV ani SARS-CoV	
Real-time PCR	Gen (N)	OC43-HCoV 229E-HCoV	Startery specyficzne dla poszczególnych koronawirusów	[24]
	ORF 1a	NL63-HCoV		
Multiplex RT-PCR	Brak danych	OC43/ HKU1 NL63/229E	Test komercyjny. Konieczność różnicowania między OC43 a HKU1 oraz NL63 a 229E	[4]
One step-RT-PCR+ sekwencjonowanie	Gen N, Gen S1, ORF1a	HKU1	Startery specyficzne dla HKU1	[48]
Real-time RT- PCR	Gen E	MERS-CoV	Test przesiewowy, większa czułość, mniejsza specyficzność	[11]
	ORF 1b	MERS-CoV	Test potwierdzenia, większa specyficzność, mniejsza czułość	[12]
	ORF 1a	MERS-CoV	Test potwierdzenia, większa specyficzność, mniejsza czułość	
Sekwencjonowanie	Gen RdRp	MERS-CoV	Różnicowanie spośród betakoronawirusów, (linia C) oraz spokrewnionych koronawirusów zwierzęcych	
RT- PCR	Gen N			Wysoce specyficzny fragment MERS-HCoV.
RT-PCR	ORF ab	Koronawirusy (pan-korona)	Możliwość wykrycia także innych niż ludzkie genotypów, ale nie wykrywa ok. 30% krążących genotypów	[22]
RT-PCR	Gen polimerazy	Koronawirusy (pan-korona)	–	
	Gen N, ORF1a, ORF1b, Gen S, Sekwencjonowanie	HCoV-NL63	Startery specyficzne dla HCoV-NL63	[36]
	Gen G	HCoV-OC43 HCoV-229E	Startery specyficzne dla HCoV-OC43 i HCoV- 229E	

częściej wykorzystywana jest technika PCR z etapem odwrotnej transkrypcji zarówno w wersji klasycznej jak i PCR w czasie rzeczywistym (real-time RT-PCR). W badaniach wykorzystywane są różne rozwiązania dotyczące stosowania starterów swoistych dla poszczególnych gatunków koronawirusów (PCR dla jednego gatunku wirusa lub multiplex PCR), poszukiwanie starterów dla wspólnego fragmentu genomu koronawirusów (ORF1a/b, białko nukleokapsydu-N lub białko powierzchniowe-S) [45], poszukiwanie fragmentów swoistych dla alfa- i betakoronawirusów [42]. Należy pamiętać, że powszechnie stosowane startery tzw. pankorona zaprojektowane do wykrywania możliwe wszystkich koronawirusów wywołujących zakażenia u ludzi nie wykrywają *HCoV-SARS* ani *HCoV-MERS* [22]. Z tego względu często stosowana jest kompilacja różnych testów RT-PCR (Tab. II).

Uważa się, że za wywołanie reakcji immunologicznej w odpowiedzi na zakażenie odpowiadają białka S i N. Białko S odpowiada za pierwszy etap infekcji, więc jest pierwszym celem odpowiedzi humoralnej i komórkowej [49]. Z kolei białko N najsilniej aktywuje swoistą odpowiedź odpornościową. Metody serologiczne opierają się na wykryciu konkretnych antygenów, bądź przeciwciał skierowanych w kierunku tych antygenów

w surowicy pacjenta. Problemem w przypadku badań obecności przeciwciał jest występowanie reakcji krzyżowych i uzyskiwanie wyników fałszywie pozytywnych. Reakcje krzyżowe najczęściej wynikają z reagujących krzyżowo epitopów antygenowych koronawirusów. Oddziaływanie z białkiem N *HCoV-SARS* stwierdzono dla przeciwciał *HCoV-229E* oraz *HCoV-OC43* [45]. Co więcej, wykrywanie przeciwciał u małych dzieci stanowi również istotny problem. Z badań Dijkman i wsp. [15] wynika, że u dzieci zaraz po urodzeniu stwierdza się bardzo wysoki poziom przeciwciał nabytych od matki przeciw białku N *HCoV-NL63*. Wykazano, że ich poziom zmniejsza się dopiero w 4–5 miesiącu życia. U dorosłych natomiast spadek miana przeciwciał, przede wszystkim skierowanych przeciw białkom powierzchniowym, następuje po upływie roku od zakażenia *HCoV*, co tłumaczy kilkukrotne reinfekcje [16]. Obecnie badania serologiczne w diagnostyce zakażeń koronawirusami są bardzo rzadko stosowane.

Koronawirusy można izolować w różnych liniach komórkowych, ale każdy z koronawirusów wykazuje powinowactwo do namnażania się w określonych komórkach. *HCoV-229E* po raz pierwszy wyizolowano w roku 1966 w hodowli wyprowadzonej z ludzkich embrionalnych komórek nerki (np. MRC5).

Obecnie wirus ten „przystosował się” do namnażania w wielu rodzajach linii komórkowych, powszechnie wykorzystywanych w laboratoriach wirusologicznych [49]. *HCoV-OC43* został wyizolowany w 1967 r. w linii komórek tchawicy oraz w komórkach wyprowadzonych z raka ludzkiego jelita grubego (linia HRT18). *HCoV-NL63* został wyizolowany w 2004 r. w hodowli komórek małpiej nerki LLC-MK2, ale namnaża się on również w komórkach wątroby, np. w linii komórkowej Huh-7. [15, 40, 49]. Natomiast *HCoV-SARS* replikuje się w hodowlach komórek małpiej nerki (np. Vero E6, LLC-MK2) ale, należy pamiętać, że namnażenie tego wirusa może być prowadzone wyłącznie w laboratorium o podwyższonym poziomie bezpieczeństwa biologicznego (BSL3 lub 4). Do roku 2010, mimo wielu prób nie udało się namnożyć *HCoV-HKU1* w liniach komórkowych. Dopiero Pyrc i wsp. [41] z powodzeniem namnożyli wirusa *in vitro* stosując hodowlę nabłonka rzęskowego układu oddechowego (HAE). Efektem namnażania koronawirusów w hodowlach komórkowych są widoczne pod mikroskopem zmiany w postaci agregatów komórkowych, syncytii czy obrzmienie komórek [35].

7. Podsumowanie

Koronawirusy, jako czynniki etiologiczne głównie łagodnych, samoustępujących zakażeń układu oddechowego, nie były wcześniej wiodącym tematem badań z punktu widzenia zdrowia publicznego. Dopiero wybuch epidemii SARS-CoV, w 2003 roku, skłonił badaczy do coraz głębszego pochylenia się nad biologią tych wirusów oraz możliwościami ewentualnego leczenia zakażeń przez nie wywołanych. Wzrost zainteresowania koronawirusami doprowadził do odkrycia 4 nowych gatunków wirusów, które, jak się okazało, od dawna krążą w środowisku człowieka powodując rokrocznie ok. 20–30% zakażeń dróg oddechowych, a w 3–15% przypadków zakażeń choroby wymagają hospitalizacji. Mimo, iż zakażenia wywołane przez koronawirusy mają głównie łagodny przebieg, występują również koronawirusy (np. *HCoV-SARS*) powodujące ciężkie infekcje, niekiedy kończące się śmiercią. Koronawirusy są chorobotwórcze zarówno dla ludzi jak i zwierząt. Wraz z rozwojem badań wykazano, że koronawirusy, które uważano za patogeny zwierząt mogą wywoływać choroby u ludzi. Biorąc pod uwagę możliwość przekraczania granicy zwierzę-człowiek oraz szybką replikację wirusów, konieczne są dalsze badania nad biologią, patogenezą oraz transmisją koronawirusów. Co więcej istnieje potrzeba wyjaśnienia związku między koronawirusami a chorobami układu nerwowego (np. stwardnienie rozsiane) czy układu pokarmowego.

Dotychczas nie opracowano skutecznej metody leczenia oraz zapobiegania zachorowaniom (szczepionki przeciwko koronawirusom), ale badania są intensywnie prowadzone. Wydaje się, że najlepszą ochroną przed infekcją koronawirusów jest właściwa higiena. Koronawirusy są wrażliwe na większość powszechnie stosowanych środków dezynfekcyjnych [49].

Piśmiennictwo

1. Abdul-Rasool S., Fielding B.C.: Understanding human coronavirus HCoV-NL63. *Open Virol. J.* **4**, 76–87 (2010)
2. Abramczuk E., Pancer K., Gut W., Lipka B., Litwińska B.: The frequency of RSV, HCoV and MERS-CoV in children with acute respiratory tract infection, Poland 2013–2014. 17th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, Praha (2014)
3. Ambrosioni J.: Role of rhinovirus load in the upper respiratory tract and severity of symptoms in lung transplant recipients. *J. Clin. Virol.* **64**, 1–5 (2015)
4. Amini R., Jahanshahi F., Amini Y., Sekawi Z., Jalilian F.A.: Detection of human coronavirus strain HKU1 in a 2 years old girl with asthma exacerbation caused by acute pharyngitis. *Virol. J.* **9**, 142 (2012)
5. Belouzard S., Millet J.K., Licitra B.N., Whittaker G.R.: Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses*, **4** (2012)
6. Cavanagh D.: Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian. Pathol.* **34**, 439–448 (2005)
7. Cebe-López M.: Viral co-infections in pediatric patients hospitalized with lower tract acute respiratory infections. *PLoS One*, **10** (2015)
8. Chiu S.S.: Human Coronavirus NL63 Infection and other coronavirus infections in children hospitalized with acute respiratory disease in Hong Kong, China. *Clin. Infect. Dis.* **40**, 1721–1729 (2005)
9. Choi E.H., Sung J.Y. i wsp.: The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children, 2000–2005. *Clin. Infect. Dis.* **43**, 585–92 (2006)
10. Chun J.K., Kim D.S. i wsp.: Establishing a surveillance network for severe lower respiratory tract infections in Korean infants and young children. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **28**, 841–844 (2009)
11. Corman V.M., Drosten C. i wsp.: Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Euro Surveill.* **17** (2012)
12. Corman V.M., Drosten C. i wsp.: Assay for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-MC) infections. *Euro Surveill.* **17**, 1–9 (2012)
13. Danielsson N., Catchpole M. i wsp.: Novel coronavirus associated with severe respiratory disease: Case definition and public health measure. *Euro Surveill.* **17** (2012)
14. da Silva R.C., Santos N. i wsp.: Frequency of viral etiology in symptomatic adult upper respiratory tract infections. *Braz. J. Infect. Dis.* **19**, 30–35 (2015)
15. Dijkman R., Jebbink M.F., Idrissi N.B.E., Pyrc K., Muller M.A., Kuijpers T.W., Zaaijer H.L., van der Hoek L.: Human coronavirus NL63 and 229E seroconversion in children. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 2368–2373 (2008)
16. Dijkman R., Hoek L.: Human coronaviruses 229E and NL63: close yet still so far. *J. Formos. Med. Assoc.* **108**, 270–279 (2009)
17. Esper F., Ou Z., Huang Y.T.: Human coronaviruses and uncommon in patients with gastrointestinal illness. *J. Clin. Virol.* **48**, 131–133 (2010)

18. Falsey A.R., Taylor S. i wsp.: Respiratory syncytial virus and other respiratory viral infections in older adults with moderate to severe influenza-like illness. *J. Infect. Dis.* **209** (2014)
19. Feng L., Yang W. i wsp.: Viral etiologies of hospitalized acute lower respiratory infection patients in China, 2009–2013. *PLoS One*, **9** (2014)
20. Garbino J., Soccia P.M., Aubert J.D., Rochat T., Meylan P., Thomas Y., Tapparel C., Bridevaux P.O., Kaiser L.: Respiratory viruses in bronchoalveolar lavage: a hospital-based cohort study in adults. *Thorax*, **64**, 399–404 (2009)
21. 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.* **48**, 2940–2947 (2010)
22. Gerna G., Campanini G., Rovida F., Percivalle E., Sarasini A., Marchi A., Baldanti F.: Genetic variability of human coronavirus OC43-, and NL63-like strains and their association with lower respiratory tract infections of hospitalized infants and immunocompromised Patients. *J. Med. Virol.* **78**, 938–949 (2006)
23. Greer R. M.: Do rhinoviruses reduce the probability of viral co-detection during acute respiratory tract infections? *J. Clin. Virol.* **45**, 10–15 (2009)
24. Gunson R.N., Collins T.C., Carman W.F.: Real-time PCR detection of 12 respiratory viral infections in four triplex reactions. *J. Clin. Virol.* **33**, 341–344 (2005)
25. Han H.J., Wen H.L., Zhou C.M., Chen F.F., Luo L.M., Liu J.W., Yu X.J.: Bats as reservoirs of severe emerging infectious diseases. *Virus Res.* **205**, 1–6 (2015)
26. Hoek L., Pyrc K., Berkhout B.: Human coronavirus NL63, a new respiratory virus. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 760–773 (2006)
27. Hoffmann J., Rabazanahary H., Randriamarotia M., Ratsimbaoa A., Najjar J., Varnet G., Contamin B., Paranhos-Baccala G.: Viral and atypical bacterial etiology of acute respiratory infections in children under 5 years old living in a rural tropical area of Madagascar. *PLoS One*, **7** (2012)
28. Jevšnik M., Uršič T., Žigon N., Lusa L., Krivec U., Petrovec M.: Coronavirus infections in hospitalized pediatric patients with acute respiratory tract disease. *BMC Infect. Dis.* **12**, 365 (2012)
29. Kocik J.: Diversity of influenza-like illness etiology in Polish armed forces in influenza epidemic season. *BTICC*, **61**, 489–494 (2014)
30. Liu T.: Viral etiology of acute respiratory tract infections in hospitalized children and adults in Shandong province. *China Virol. J.* **12**, 168 (2015)
31. Liao X., Rong Z. i wsp.: New epidemiological and clinical signatures of 18 pathogens from respiratory tract infections based on a 5-year study. *PLoS One*, **10** (2015)
32. Lukšić I., Kearns P.K., Scott F., Rudan I., Campbell H., Nair H.: Viral etiology of hospitalized acute lower respiratory infections in children under 5 years of age – a systematic review and meta-analysis. *Croat. Med. J.* **54**, 122–134 (2013)
33. Lundin A., Trybala E. i wsp.: Targeting membrane-bound viral RNA synthesis reveals potent inhibition of diverse coronaviruses including the Middle East respiratory syndrome virus. *PLOS Pathogens*, **10** (2014)
34. Mackay I.M., Arden K.E., Speicher D.J., O’Neil N.T., McErlean P.K., Greer R.M., Nissen M.D., Sloots T.P.: Co-circulation of four human coronaviruses (HCoV) in Queensland children with acute respiratory tract illnesses in 2004. *Viruses*, **4**, 637–653 (2012)
35. Mesel-Lemoine M., Tangy F. i wsp.: A human coronavirus responsible for the common cold massively kills dendritic cells but not monocytes. *J. Virol.* **86**, 7577–7587 (2012)
36. Moes E., Ranst M.V. i wsp.: A novel pancoronavirus RT-PCR assay: frequent detection of human coronavirus NL63 in children hospitalized with respiratory tract infections in Belgium. *BMC Infect. Dis.* **5** (2005)
37. Minosse C., Capobianchi M.R. i wsp.: Frequency of detection of respiratory viruses in the lower respiratory tract of hospitalized adults. *J. Clin. Virol.* **42**, 215–220 (2008)
38. Nishiura H., Mizumoto K., Ejima M., Zhong Y., Cowling B.J., Omori R.: Incubation period as part of the case definition of severe respiratory illness caused by a novel coronavirus. *Euro Surveill.* **17** (2012)
39. Perlman S., Netland J.: Coronaviruses post-SARS: Update on replication and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 439–450 (2009)
40. Pyrc K., Berkhout B., Hoek L.: The novel human coronavirus NL63 and HKU1. *J. Virol.* **81**, 3051–3057 (2007)
41. Pyrc K., Pickles R. i wsp.: Culturing the Unculturable: Human coronavirus HKU1 infects, replicates, and produces progeny virions in human ciliated airway epithelial cell cultures. *J. Virol.* **84**, 11255–11263 (2010)
42. Pyrc K., Potempa J. i wsp.: Use of sensitive, broad-spectrum molecular assay and human airway epithelium cultures for detection of respiratory pathogens. *PLoS One*, **7**, e: 32582 (2012)
43. Raj V.S., Osterhaus A.D.M.E., Fouchier R.A.M., Haagmans B.L.: MERS: emergence of a novel human coronavirus. *Curr. Opin. Virol.* **58**, 62 (2014)
44. Ren L., Wang J. i wsp.: Prevalence of human respiratory viruses in adults with acute respiratory tract infections in Beijing, 2005–2007. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**, 1146–1153 (2009)
45. Sarah L.W., Little Z.R., Keevil C.W.: Human coronavirus 229E remains infectious on common touch surface materials. *mBio*. **6**, 1697–1715 (2015)
46. Sloots T.P., Whitley D.M., Lambert S.B., Nissen M.D.: Emerging respiratory agents: New viruses for old diseases? *J. Virol.* **42**, 233–243 (2008)
47. Ujike M., Taguchi F.: Incorporation of spike and membrane glycoproteins into coronavirus virions. *Viruses*, **7**, 1700–1725 (2015)
48. Vabret A., Dina J., Gouarin S., Petitjean J., Corbet S., Freymuth F.: Detection of the new human coronavirus HKU1: a report of 6 cases. *Clin. Inf. Dis.* **42**, 634–639 (2006)
49. Vabret A., Dina J., Brison E., Brouard J., Freymuth F.: Human coronaviruses (HCoV). *Pathol. Bio.* **57**, 149–160 (2009)
50. Vijaykrishna D., Smith G.J.D., Zhang J.X., Peiris J.S.M., Chen H., Guan Y.: Evolutionary insights into the ecology of coronaviruses. *J. Virol.* **81**, 4012–4020 (2007)
51. World Health Organization: Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) summary of current situation. Literature update and risk assessment 7 July 2015, http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/179184/2/WHO_MERS_RA_15.1_eng.pdf (16.09.2016)
52. Xiao F., Burns K.D. i wsp.: Increased urinary angiotensin-converting enzyme 2 in renal transplant patients with diabetes. *PLoS One*, **7** (2012)
53. Yang Y., Liu C., Du L., Jiang S., Shi Z., Baric R.S., Li F.: Two mutations were critical for Bat0to-Human transmission of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* **89**, 87–90 (2015)
54. Zaki A.M., Fouchier R.A.M. i wsp.: Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1814–1820 (2012)
55. Zhu X., Liu Q., Du L., Lu L., Jiang S.: Receptor-binding domain as a target for developing SARS vaccines. *J. Thorac. Dis.* **5** (2013)