

МРНТИ 34.25.05

<https://doi.org/10.26577/eb.2022.v90.i1.07>

К.Д. Жугунисов¹, А.А. Керимбаев¹, С.К. Копеев¹,
Б.Ш. Мырзахметова¹, М.С. Туысканова^{1,2*}, А.К. Наханов¹,
Б.М. Хайруллин¹, М.Б. Орынбаев¹, Е.О. Абдураимов¹,
М.М. Касенов¹, К. Закарья¹, Л.Б. Кутумбетов¹

¹Научный Исследовательский Институт Проблем Биологической Безопасности,
Казахстан, пгт. Гвардейский

²Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы
*e-mail: monica_94@list.ru

ВИРУС SARS-COV-2: ВЫДЕЛЕНИЕ, КУЛЬТИВИРОВАНИЕ, ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ, ИНАКТИВАЦИЯ И ПАССИРОВАНИЕ

Коронавирусы – это большое семейство РНК-содержащих вирусов, способных инфицировать человека и ряд видов животных. В настоящее время известно о циркуляции среди населения нескольких видов коронавирусов, которые, как правило, вызывают заболевания верхних дыхательных путей и легких со средней тяжестью. К этому списку прибавилась новая коронавирусная инфекция COVID-19 (SARS-CoV-2). Вирус быстро распространился во все страны мира. В последнее время в Казахстане данная инфекция наблюдается с ярко выраженной пневмонией среди населения.

Следует отметить, что при работе с живым вирусом мы столкнулись с некоторыми вопросами касающихся биологической и физико-химических свойств вируса, которые остались вне внимания ученых мира. В связи с этим, в этих исследованиях нами были изучены некоторые физико-химические и биологические свойства казахстанского штамма вируса SARS-CoV-2,

Проведены исследования по поиску дополнительных биологических моделей, чувствительных к вирусу SARS-CoV-2 и используемых *in vitro*. Установлено, наиболее чувствительными к вирусу SARS-CoV-2 были культуры клеток обезьян и свиней, в которых вирус активно репродуцировался.

Были изучены влияние условий хранения образцов нуклеиновых кислот вируса SARS-CoV-2, а также влияние условий окружающей среды к самому вирусу SARS-CoV-2. Результаты проведенных нами исследований показали, что процесс замораживания при температуре минус 70°C и размораживания при комнатной температуре (20-22°C) не оказывает заметного влияния на качественный характер цитопатогенности, но оказывает негативное влияние на сохранность титра вируса.

Данные о влиянии химических факторов при работе с возбудителями болезней необходимы для создания условий биологической безопасности для персонала и окружающей среды. В данном исследовании нами изучено влияние формальдегида к вирусу. Полученные результаты показывают, что инактивация вируса Sars-CoV-2 с помощью формалина зависит от концентрации формальдегида, температуры реакции, времени инкубации.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, культуры клеток, выделение, культивирование, термостабильность, инактивация, пассирование.

K. Zhugunissov¹, A. Kerimbayev¹, S. Kopeev¹, B. Myrzakhmetova¹,
M. Tuyskanova^{1,2*}, A. Nakhanov¹, B. Khairullin¹, M. Orynbayev¹,
Ye. Abduraimov¹, M. Kassenov¹, K. Zakarya¹, L. Kutumbetov¹

¹Research Institute for Biological Safety Problems, Kazakhstan, Gvardeisky township

²Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

*e-mail: monica_94@list.ru

SARS-CoV-2 virus: isolation, growth, thermostability, inactivation and passages

Coronaviruses are a large family of RNA-containing viruses capable of infecting humans and a number of animal species. At present, several types of coronaviruses are known to circulate among the population, causing diseases of the upper respiratory tract and lungs of moderate severity. The COVID-19 dis-

ease has been added to this list. The virus has spread rapidly around the world. Recently in Kazakhstan, this infection has been observed with pronounced pneumonia among the population.

It should be noted that when working with a live virus, we encountered some questions regarding the biological and physico-chemical properties of the virus, which remained outside the attention of world scientists. In this regard, in these studies, we studied some of the physicochemical and biological properties of the Kazakh strain of the SARS-CoV-2 virus.

Studies were conducted to find additional biological models sensitive to the SARS-CoV-2 virus and used in vitro. Of the 11 cell culture species tested, monkey and pig cells were found to be the most sensitive to the SARS-CoV-2 virus, in which the virus was actively reproducing.

We studied the effect of storage conditions of SARS-CoV-2 nucleic acid samples as well as the effect of environmental conditions on the SARS-CoV-2 virus itself. The results of our studies showed that freezing at minus 70 °C and thawing at room temperature (20-22 °C) had no appreciable effect on the qualitative character of cytopathogenicity but had a negative effect on the preservation of virus titer.

Data on the influence of chemical factors when working with pathogens are necessary to create conditions for biological safety for personnel and the environment. In this study, we studied the effect of formaldehyde on the virus. The results obtained show that the inactivation of the Sars-CoV-2 virus by formalin depends on its concentration, reaction temperature, and incubation time.

Key words: SARS-CoV-2, cell culture, isolation, growth, thermostability, inactivation, passages.

Қ.Д. Жүгінісов¹, А.А. Керімбаев¹, С.К. Көпеев¹, Б.Ш. Мырзахметова¹,
М.С. Туысқанова^{1,2*}, А.К. Наханов¹, Б.М. Хайруллин¹, М.Б. Орынбаев¹,
Е.О. Абдураимов¹, М.М. Қасенов¹, К. Закарья¹, Л.Б. Құтұмбетов¹

¹Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми зерттеу институты, Қазақстан, Гвардейский қ.а.

²Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

*e-mail: monica_94@list.ru

SARS-CoV-2 вирусын оқшаулау, өсіру, термотұрақтылығы, инактивтендіру және пассаждау

Коронавирустар – адам мен жануарларда бірқатар ауру түрлерін тудыратын РНҚ-лы вирустардың үлкен тобы. Қазіргі уақытта адамдар популяциясында белгілі коронавирустың бірнеше түрі белгілі, олар, әдетте, жоғарғы тыныс жолдарының және орташа ауырлықтағы өкпе ауруларын тудырады. Бұл тізімге жаңа COVID-19 коронавирустық инфекциясы қосылды (SARS-CoV-2). Вирус әлемнің барлық елдеріне тез таралды. Соңғы уақытта Қазақстанда бұл инфекция халық арасында айқын пневмониямен байқалады.

Айта кету керек, тірі вируспен жұмыс жасау кезінде біз әлем ғалымдарының назарынан тыс қалған вирустың биологиялық және физика-химиялық қасиеттеріне қатысты кейбір мәселелерге тап болдық. Осыған байланысты, осы зерттеулерде біз COVID-19 жаңа коронавирустық инфекциясымен ауырған науқас пациенттен оқшауланған SARS-CoV-2 вирусының қазақстандық штаммының кейбір физикалық-химиялық және биологиялық қасиеттерін, мысалы.

SARS-CoV-2 вирусына сезімтал және in vitro жағдайында қолдануға болатын қосымша биологиялық модельдерді іздеу бойынша зерттеулер жүргізілді. Тексерілген 11 жасуша дақылдарының ішінен SARS-CoV-2 вирусына ең сезімтал маймылдар мен шошқалардың жасуша культураларында екендігі анықталды, онда вирус белсенді түрде көбейтілді.

SARS-CoV-2 вирусының нуклеин қышқылдарының үлгілерін сақтау жағдайларының әсері, сондай-ақ SARS-CoV-2 вирусының қоршаған орта жағдайларының әсері зерттелді. Біз жүргізген зерттеулердің нәтижелері минус 70 °C температурада мұздату және бөлме температурасында еріту процесі (20-22 °C) цитопатогенділіктің сапалық сипатына айтарлықтай әсер етпейтінін, бірақ вирус титрінің сақталуына теріс әсер ететінін көрсетті.

Ауру қоздырғыштарымен жұмыс істеу кезінде химиялық факторлардың әсері туралы деректер персонал мен қоршаған орта үшін биологиялық қауіпсіздік жағдайларын жасау, сондай-ақ диагностикалық және профилактикалық мақсаттағы биологиялық препараттарды дайындау технологияларын жобалау үшін қажет. Бұл зерттеуде біз формальдегидтің вирусқа әсерін зерттедік. Нәтижелер SARS-CoV-2 вирусын формалинмен инактивациялау формальдегид концентрациясына, реакция температурасына, инкубация уақытына байланысты екенін көрсетеді.

Түйін сөздер: SARS-CoV-2, жасуша культуралары, оқшаулау, өсіру, термотұрақтылығы, инактивтендіру, пассаждау.

Сокращения и обозначения

WHO – Всемирная организация здравоохранения;

ATCC – Американская коллекция типовых культур (Манассас, штат Виргиния, США);

НИИПББ – Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности (Гвардейский, Казахстан);

DMEM – Модифицированная среда Дюльбекко;

КРС – крупный рогатый скот;

ЦПД – цитопатическое действие;

ФБР – фосфатно буферный раствор

Введение

Коронавирусы – это большое семейство РНК-содержащих вирусов, способных инфицировать человека и ряд видов животных [1-3]. У людей коронавирусы могут вызвать целый ряд заболеваний – от легких форм острой респираторной инфекции до тяжелого острого респираторного синдрома [3, 4]. В настоящее время известно о циркуляции среди населения следующих коронавирусов: HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-NKU1, SARS-CoV, MERS-CoV, которые, как правило, вызывают заболевания верхних дыхательных путей и легких со средней тяжестью [5, 6]. К этому списку прибавилась новая коронавирусная инфекция COVID-19 (SARS-CoV-2), которая была зарегистрирована в КНР в конце декабря 2019 года в Ухане. Вирус быстро распространился во все страны мира [7], и 13 марта 2020 года была впервые зарегистрирована на территории Республики Казахстан [8]. В последнее время в Казахстане данная инфекция наблюдается с ярко выраженной пневмонией среди населения (неопубликованные данные).

После появления высоко патогенного для человека нового коронавируса SARS-CoV-2 учеными мира были получены данные о его происхождении [9-11], распространении [12], эволюции [13, 14], генетики [15, 16, 17, 18], биологических [19], физико-химических [20] и патогенных свойствах [21, 22], а также о патогенезе [23], методы диагностики и лечения вызываемой им заболеванием [24]. Многие исследования, проводимые в странах мира, были направлены на разработку собственных вакцин для быстрого реагирования и ликвидации данной инфекции с последующим изучением их безопасности и иммуногенности на животных и людях. Казахстан также прису-

пил к разработке отечественных вакцин против новой коронавирусной инфекции, из которых 2 вакцины находятся на I/II и III стадии клинических испытаний, еще две проходят доклинические испытания (данные неопубликованы). При разработке вакцины нами пришлось работать с живым вирусом SARS-CoV-2, который был выделен от больного пациента, заболевшего новой коронавирусной инфекцией COVID-19. Работа с новым вирусом коронавирусной инфекции требуют строгого соблюдения биологической безопасности, опыта и новых знаний биологической особенности вируса SARS-CoV-2. Следует отметить, что при работе с живым вирусом мы столкнулись с некоторыми вопросами касающихся биологической и физико-химических свойств вируса, которые остались вне внимания ученых мира. В связи с этим, в этих исследованиях нами были изучены некоторые физико-химические и биологические свойства казахстанского штамма вируса SARS-CoV-2, выделенного от больного пациента, заболевшего новой коронавирусной инфекцией COVID-19, такие как термостабильность (сохраняемость), инактивация вируса различными концентрациями формальдегида при различных температурно-временных режимах и пассирование вируса в культуре клеток.

Материалы и методы

Клинические образцы. В данной работе нами были использованы назофарингеальные смывы (мазки), полученные от 6 больных пациентов с диагнозом «SARS-CoV-2», получающих терапию в городской инфекционной клинической больнице имени И. Жекеновой г. Алматы. Эти пробы были взяты медицинскими сотрудниками городской инфекционной больницы и переданы в лабораторию НИИПББ, соблюдая международные и отечественные требования при транспортировке клинических образцов [25, 26, 27]. Эти образцы использовали в качестве источника возбудителя коронавирусной инфекции для заражения культуры клеток с последующим выделением данного вируса.

Культуры клеток и питательная среда. В данной работе мы использовали перевиваемые и первичные линии культуры клеток, различного происхождения представленные в таблице 1, которые выращивали в соответствующих питательных средах, содержащих 10 % фетальной сыворотки КРС и 200 мкг/мл стрептомицина, 200 Ед/мл пенициллина и 400 мкг/мл гентамицина.

Таблица 1 – Клеточные линии приматов и других животных, использованные в исследовании

Название и происхождение клеточной линии	Аббревиатура	Источник клеточной линии	Среда для клеточной линии
Клетки приматов			
Почка африканской зеленой мартышки	Vero	WHO	DMEM (Invitrogen, Carlsbad, USA)
Почка эмбриона макаки-резус	Ma-104	ATCC	DMEM (Invitrogen, Carlsbad, USA)
Почка эмбриона макаки-резус (клон Ma-104)	MARC-145	ATCC	DMEM (Invitrogen, Carlsbad, USA)
Клетки кошек			
Почка кошки	CRFK	ATCC CCL-94	DMEM (Invitrogen, Carlsbad, USA)
Клетки собаки			
Почка щенка	PK	Внутренняя разработка (НИИПББ)	DMEM (Invitrogen, Carlsbad, USA)
Почка собаки Мадин-Дарби	MDCK	ВОЗ	DMEM (Invitrogen, Carlsbad, USA)
Клетки свиньи			
Почка свиньи	PK-15	Разработана в НИИПББ	DMEM (Invitrogen, Carlsbad, USA)
Эмбриональная линия привитых эпителиальных клеток почки свиньи	SPEV	Московский НИИ вирусных препаратов (РФ)	DMEM (Invitrogen, Carlsbad, USA)
Клетки хомяка			
Фибробласт почки хомячка	BHK21	ATCC CCL-10	DMEM (Invitrogen, Carlsbad, USA)
Клетки кролика			
Почка кролика	RK-13	ATCC CCL-37	DMEM (Invitrogen, Carlsbad, USA)
Клетки овцы			
Почка ягненка	LK	Разработана в НИИПББ	DMEM (Invitrogen, Carlsbad, USA)

WHO = Всемирная организация здравоохранения.

ATCC = Американская коллекция типовых культур (Манассас, штат Виргиния, США).

НИИПББ = Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности (Гвардейский, Казахстан)

DMEM = Модифицированная среда Дюльбекко

Выделение вируса в культуре клеток. На монослой культуры клеток Vero, после удаления питательной среды, наносили кровь и суспензию смывов слизистой оболочки носовой полости больных в объеме 0,5 мл и выдерживали в течение 60 минут при температуре 37 °С. Затем инокулят удаляли, монослой промывали в трех сменах раствором PBS, вносили поддерживающую среду DMEM с фетальной сывороткой крови и продолжали культивирование при температуре 37 °С с ежедневной микроскопией монослоя культуры клеток. Наличие вируса устанавливали по цитопатогенному действию в зараженных культурах клеток сравнительно с контрольной незараженной культурой клеток. В случае отсутствия ЦПД в культуре клеток Vero, зараженной

образцами биоматериалов, проводили «слепое» пассирование в течение не менее трех генераций.

Культивирование вируса в различных культурах клеток.

Для изучения чувствительности различных культур клеток к вирусу SARS-CoV-2 использовали первичные и перевиваемые линии клеток, которые представлены в таблице 1. Перед заражением удаляли питательные среды из культуральных сосудов и вносили вирус со множественностью заражения 0,1 ТЦД₅₀/кл в объеме по 0,5 мл на каждый сосуд и инкубировали при 37,0±0,5 °С в течение 1 ч для адсорбции вируса. После адсорбции суспензию удаляли, вносили поддерживающую среду, содержащую 2% фетальной сыворотки КРС, и инкубировали при

37,0±0,5 °С в течение 5 сут или до наступления 90-100 % ЦПД вируса. Состояние монослоя клеток для определения ЦПД вируса оценивали при просмотре культуральных сосудов под инвертированным микроскопом Olympus CKX31 («Olympus Co.», Япония). При последующем пассаже культуры клеток инфицировали размороженной вирусосодержащей суспензией в объеме 0,5 мл на каждый сосуд. О перmissивности культур клеток судили по наличию цитопатических изменений в монослое и изменению титра вируса в процессе пассирования. Инфекционную активность вируса определяли титрованием в 1-2-суточной клеточной линии VERO, выращенной в 96-луночных микропланшетах.

Адаптация вируса к культуре клеток

При адаптации вируса к культуре клеток Vero применяли метод серийного пассирования. Культуру клеток Vero выращивали в среде DMEM с 10 % фетальной сыворотки КРС. При образовании сплошного монослоя (через 24 ч) из культуральных сосудов удаляли ростовую среду и вносили вирус со множественностью заражения 0,1, 0,01 0,001 ТЦД50/кл в зависимости от пассажа вируса в культуре клеток. Адсорбцию вируса проводили в течение 1 ч при 37,0±0,5 °С. После этого вносили поддерживающую среду, содержащую 2 % фетальной сыворотки КРС. Инфицированную культуру клеток инкубировали при 37,0±0,5 °С в течение 5 сут или до наступления 90-100 % ЦПД вируса. Затем культуру клеток и культуральную жидкость замораживали при -50,0±0,5 °С. При следующем пассаже, культуры клеток инфицировали размороженной вирусосодержащей суспензией. Инфекционную активность вируса определяли титрованием в 1-2-суточной культуре клеток VERO, выращенной в 96-луночных микропланшетах. Титр вируса рассчитывали по методу Reed-Muench и выражали в lg ТЦД50/см³ (24).

Сохраняемость вируса Sars-Cov-2 после трехкратного замораживания и оттаивания.

Исходный материал вируса Sars-Cov-2 с титром 5,66±0,28 lg ТЦД50/мл аликвотировали по 1 мл в 9 плотно закрытые 1,5-мл микроцентрифужные пробирки и замораживали при -70 °С в течение 24 ч. По истечении этого времени, размораживали при комнатной температуре до полного оттаивания (однократное замораживание и оттаивание). После чего 3 пробирки с вирусом титровали в культуре клеток Vero по отдельности, для определения инфекционной активности. Оставшиеся 6 пробирок повторно замораживали

при температуре -70 °С в течение 24 ч (двукратное замораживание и оттаивание). На следующий день оставшиеся 6 пробирок с вирусом размораживали при комнатной температуре. После полного оттаивания, 3 пробирки титровали в культуре клеток, оставшиеся 3 пробирки с вирусом вновь замораживали при -70 °С до следующего дня, с последующим титрованием вируса на культуре клеток Vero (трехкратное замораживание и оттаивание).

Обработка формальдегидом

Инактивацию вируса формальдегидом проводили в закрытых стеклянных колбах. При этом, в опыте были использованы вирус с титром 6,25±0,22 lg ТЦД50/мл. Перед инактивацией вируса готовили 3 % рабочий водный раствор формальдегида из 37% водного раствора формальдегида. К вирусной суспензии добавляли 3 % рабочий раствор формальдегида до концентрации 0,05 % и 0,1 %. Далее вирусную суспензию инкубировали при температурах (4-8)°С, (20-22)°С и (37±0,5) °С. Колбы с реакционной смесью постоянно перемешивали с помощью магнитной мешалки со скоростью вращения 60-80 об/мин. Каждый час отбирали пробы, прекращали действие инактиванта добавлением 25% раствора бисульфит натрия в концентрации пропорциональной по молекулярной массе формальдегиду, добавленному в биомассу и помещали в холодильник при температуре 4-60 С. Инфекционная активность вируса определялась по общепринятой методике с учётом результатов титрования по методу Reed-Muench [28] и выражением в lg ТЦД50/мл.

Титрование вируса. Инфекционную активность вируса определяли методом титрований согласно методике Reed-Muench [28] в культуре клеток Vero, выращенной в 96-луночном культуральном микропланшете. Вкратце, последовательные 10-кратные разведения исходного материала вируса от 10⁻¹ до 10⁻⁸ готовили в среде DMEM с добавлением 2% ФБР, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, и 100 мкл разведенного вируса добавляли в каждую лунку. Клетки инкубировали при 37° С в атмосфере 5% CO₂ в течение 7 дней, и наличие цитопатического эффекта оценивали с использованием инвертированного микроскопа. Титр вируса рассчитывали по формуле Reed-Muench, выражали в lg ТЦД50/мл.

Выделение РНК. РНК была извлечена из клинических образцов, а также из культуральных пассажных материалов (1 и 2 пассажа) с

помощью QIAamp viral RNA mini kit (QIAGEN, Хильден, Германия) согласно инструкции производителя.

RT-ПЦР в реальном времени. Для амплификации N гена вируса SARS-CoV-2 были использованы следующие праймеры и зонд: N_Sarbeco_F (cacattggcaccgcgaatc), N_Sarbeco_R (gaggaacgagaagagccttg) и N_Sarbeco_P (fam-acttcctcaaggaacaacattgccca-bbq) [29]. Вирусный геном оценивали с помощью количественной ПЦР в реальном времени с использованием набора Superscript® III Platinum One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase системы (Invitrogen, США) согласно инструкции изготовителя. Реакции проводили в термоциклере Rotor-Gene 6000 Series (Qiagen, Германия) по следующей программе: 1 цикл обратной транскрипции при 50°C в течение 20 мин, 1 цикл 95°C в течение 3 мин, затем 45 циклов 95°C в течение 15 с, 58°C в течение 30 с.

Статистический анализ

Статистический анализ результатов исследований проводили с использованием программы GraphPadPrism 6. Для всех данных была применена описательная статистика: подсчитаны средние значения (M), стандартное отклонение (SD) и стандартные ошибки

среднего (SEM). Мы сравнили репликацию вируса SARS-CoV-2 в различных клеточных линиях с односторонним дисперсионным анализом ANOVA.

Результаты

Выделение и идентификация вируса

Клинические образцы (мазки) собранные от шести пациентов были исследованы в ПЦР на наличие РНК вируса SARS-CoV-2 (табл. 2). Только в одном образце (назальный мазок) у пациента №1 был обнаружен вирусный геном (значение Ct 25.4) на уровне положительного контроля (значение Ct 24.1). Во всех остальных клинических образцах обнаружены низкие уровни вирусного генома. Диапазон значений Ct остальных пациентов в крови было в пределах 34.1–40.1, а в мазках составляло 35.9–40.7 (результаты не показаны).

После заражения клиническими образцами культуры клеток был выделен вирус на первом пассаже только из назального мазка пациента №1. В других биологических образцах наличие цитопатогенного агента не удалось выявить в течение 3-х последовательных пассажей (результаты не показаны).

Таблица 2 – Результаты ПЦР-исследований и выделения вируса в культуре клеток

Пациент	Исходная проба		Номера пассажей									
	Титр вируса, ТЦД _{50/мл}	Ct значение	1		2		3		4		5	
			Титр вируса, ТЦД _{50/мл}	Ст значение	Титр вируса, ТЦД _{50/мл}	Ст значение	Титр вируса, ТЦД _{50/мл}	Ст значение	Титр вируса, ТЦД _{50/мл}	Ст значение	Титр вируса, ТЦД _{50/мл}	Ст значение
№ 1	1,66 ± 0.28	25,4	2.75 ± 0.25	17.3	4,58 ± 0.14	15.4	5,41 ± 0.28	13.3	5,66 ± 0.28	13.1	6,08 ± 0.38	13.2

На первом пассажном уровне цитопатическое действие вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero проявлялось, начиная с третьего дня после заражения. Со временем количество округляющихся и десквамируемых клеток увеличивается (рис.1б), на поверхности адгезии (в монослое культуры клеток) уменьшается количество расплывшихся клеток, формируются очаги пустоты, вследствие открепившихся кле-

ток (рис.1в) и увеличение межклеточного пространства при сравнении с контрольной культурой (рис.1а). Полная деструкция монослоя посредством отслоения/десквамации пораженных клеток наступала в течение 48-72 часов после появления признаков цитопатологии. Наличие вируса SARS-CoV-2 дополнительно было подтверждено методом электронной микроскопии (рис. 1в).

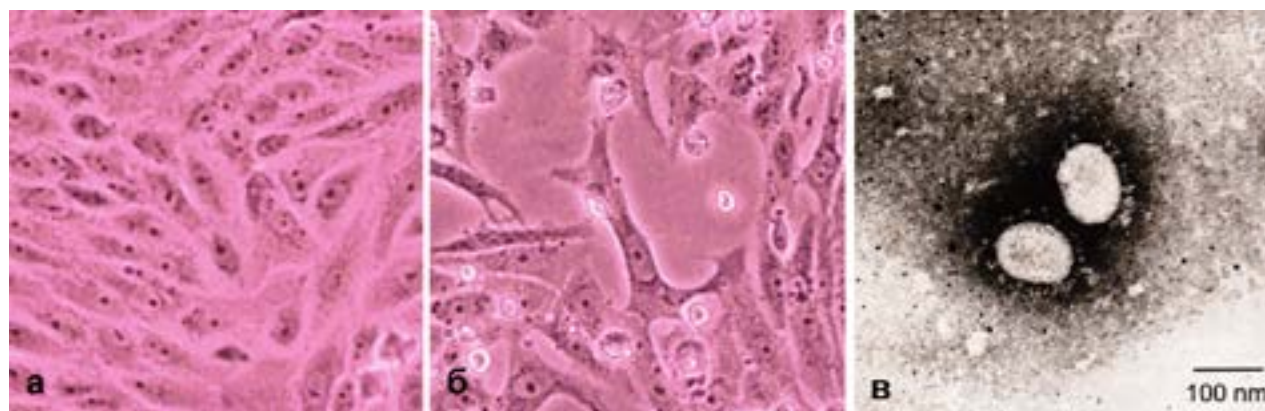


Рисунок 1 – неинфицированные клетки Vero, б – клетки Vero, зараженные вирусом SARS-CoV-2, на 3 день после заражения вирусом, в – электронная микрофотография вируса SARS-CoV-2.

Чувствительность различных клеточных линий к вирусу

В исследованиях были использованы 11 различных клеточных линий первичного и перевиваемого происхождения (таблица 1). В результате исследований установлено, что из 11 испытанных культур клеток наиболее чувствительными к вирусу SARS-CoV-2 оказались культуры клеток Vero, MARC-145, MA-104, СПЭВ, РК-15. ЦПД вируса проявлялось в этих клетках

через 24-48 ч и на 3-5 сут оно развивалось по всему монослою, поражая до 70-80 % клеток. Титр вируса в этих культурах клеток колебался в пределах 3,16-5,66 lg ТЦД₅₀/см³ (рис. 2). Адаптация вируса в культуре клеток Vero происходила более быстро, нежели в других чувствительных клеточных линиях. Культуры клеток МДСК, РК-13, ТЯ, ПЩ, ВНК-21, CRFK оказались менее или полностью не чувствительными к испытываемому вирусу.

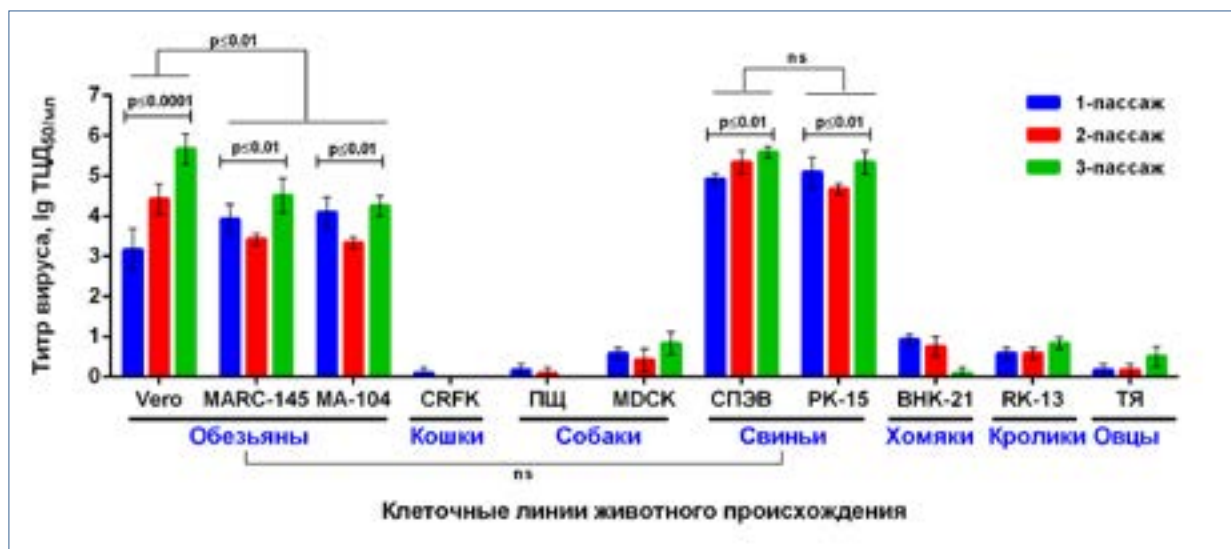


Рисунок 2 – Чувствительность различных культур клеток к вирусу SARS-CoV-2. Для первичного заражения испытуемых культур клеток (MARC-145, Ma-104, CRFK, РК, МДСК, SPEV, РК-15, ВНК-21, РК-13, LT) был использован вирус Sars-cov-2 с титром 5,66±0.28 lg ТЦД₅₀/мл, а для Vero использован назофарингеальный мазок с титром 1,66±0.28 lg ТЦД₅₀/мл. Одиннадцать клеточных линий из различных тканей или органов обезьяньего, свиного, собачьего, кошачьего, хомячьего, кроличьего и овечьего происхождения заражали вирусом SARS-CoV-2 при 0,1 ТЦД₅₀. Титры вирусных суспензии, наработанных в различных культурах клеток определены в культуре клеток Vero методом титрования на культуральных планшетах. Титр вируса показан в средних значениях со стандартным отклонением ±SD. Статистическая значимость рассчитывалась с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA

Последовательное пассирование вируса Sars-Cov-2 в клетках Vero

Клеточная линия Vero оказалась наиболее восприимчивой к инфекции вируса Sars-Cov-2 среди протестированных типов клеток позвоночных. Вирус Sars-Cov-2 был успешно пассирован путем переноса вирусной суспензии в течение 100 пассажей при температуре

инкубации 37 °С. При этом было установлено, что происходит адаптация вируса после каждого слепого пассажа в клетках Vero, сокращая начало срока цитопатического действия и срока культивирования. К тому же несмотря на уменьшение дозы заражения, титр вируса увеличивался с каждым пассажем (таблица 3).

Таблица 3 – Результаты адаптации вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток методом последовательных пассажей

Пассаж	Доза заражения, ТЦД _{50/мл}	Начало срока проявления ЦПД, ч	Срок культивирования, ч	Инфекционный титр вируса, lg10 ТЦД _{50/мл}
1-5	0.1	72-96	165±5	4.66±0.28
5-10	0.1	72-96	148±5	6.61±0.23
10-20	0.01	72±5	120±5	6.75±0.21
20-30	0.01	48±2	72±5	6.75±0.21
30-40	0.001	36±3	48±3	7.25±0.18
40-50	0.001	24±3	36±2	7.00±0.10
50-100	0.001	24±3	36±2	7.25±0.18

Сохраняемость вируса Sars-Cov-2 после 1-, 2- и 3 кратных замораживаний при температуре минус 70 °С и оттаивания при комнатной температуре (20-22 °С)

Результаты проведенных исследований показали (таблица 4), что процесс замораживания при температуре минус 70°С и размораживания при комнатной температуре (20-22 °С) не оказы-

вает заметного влияния на качественный характер цитопатогенности вируса. Проявление ЦПД вируса в монослое клеток отмечался на 30-48 ч. Однако данный физический фактор оказывает существенное негативное влияние на сохранность инфекционного титра вируса. При этом инфекционный титр вируса в культуральной суспензии снизился от 0,50 до 0,92 lgТЦД₅₀.

Таблица 4 – Сохраняемость вируса после воздействия физических факторов

	0*	1*	2**	3***
Инфекционный титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /мл	5,66±0.28	5,16±0.23	4,91±0.18	4,74±0.11
Проявление ЦПД вируса в монослое, час	30-48	30-48	30-48	30-48
Потеря инфекционного титра вируса	-	0.5	0.75 (0.25)	0.92 (0.17)
Примечания: 0* – исходный титр вируса до замораживания 1* – титр вируса после однократного замораживания при минус 70°С и размораживания при комнатной температуре (20-22 °С) 2** – титр вируса после двукратного замораживания при минус 70°С и размораживания при комнатной температуре (20-22 °С) 3*** – титр вируса после трехкратного замораживания при минус 70°С и размораживания при комнатной температуре (20-22 °С)				

Инаktivация вируса формальдегидом

Скорость инаktivации вируса Sars-Cov-2 под воздействием формальдегида в испытан-

ных концентрациях при различных температурах демонстрируется на рисунке. При конечных концентрациях формальдегида 0,05 и 0,1% при

температуре 37°C вирус теряет инфекционность для культур клеток через 2 часа. При комнатной температуре испытуемых концентраций формальдегида вирус теряет инфекционность для культуры клеток через 4 часа. При температуре 4°C инактивация вируса формальдегидом происходит значительно медленнее, чем при температурах 22°C и 37°C.

Так, обработка 0,1% и 0,05% растворами формалина при 4°C в течение 5 и 6 часа, соответственно ведет к полной потере его инфекционности для культуры клеток, а остаточную инерционность вируса для культуры клеток полностью утратил на 8 и 10 сутки, соответственно.

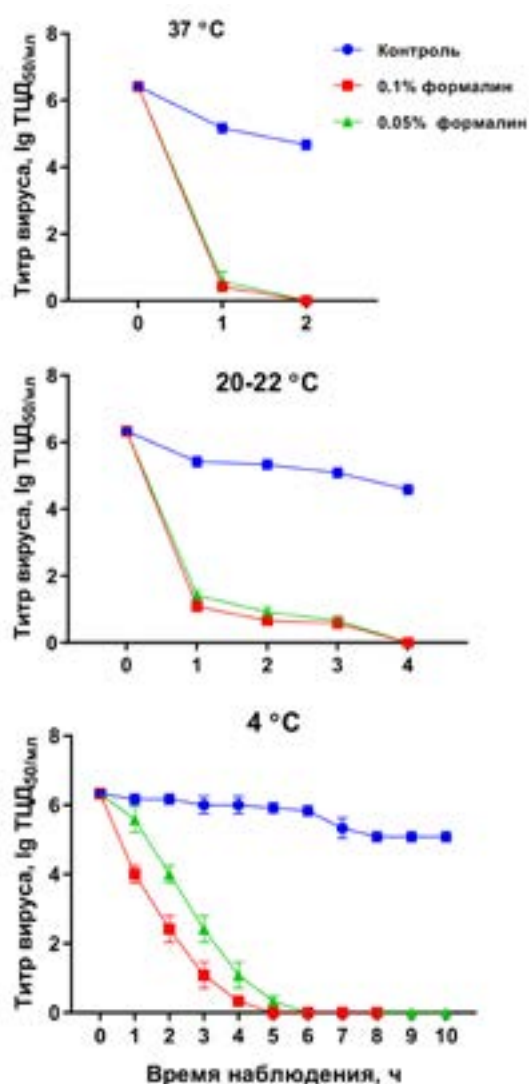


Рисунок 3 – Сроки и кинетики инактивации вирусосодержащей суспензии штамма Sars-Cov-2 растворами формалина (в) при температуре 4 °C, 22 °C и 37 °C

Обсуждение

За последних 10 лет вирусология сосредоточилась на изучении молекулярно-генетических свойств возбудителей вирусных инфекций, тогда как изучение физико-химических и биологических свойств вирусов остались вне внимания. Так, несмотря на проведенные исследования, касающиеся биологических и физико-химических свойств, многие основные вирусологические вопросы SARS-CoV-2 остаются без ответа. В данном исследовании мы выделили вирус Sars-Cov2, который в последующем был идентифицирован в ПЦР, секвенирован по N генам, изучена морфология с помощью электронной микроскопии. Цитопатологические действия вируса [30], морфология вириона [31] и нуклеотидная последовательность по N генам [32] ранее проведенные другими исследователями соответствуют выше приведенным нашим исследованиям.

Проведены исследования по поиску дополнительных биологических моделей, чувствительных к вирусу SARS-CoV-2 и используемых *in vitro*. Наличие таких моделей, кроме человеческого и обезьяньего происхождения, даст возможность подобрать биологическую модель, используемую для репродукции вируса и воспроизведения болезни *in vivo*. В связи с этим в данных исследованиях нами были проанализированы и в качестве таких объектов использовались биологические системы, имеющиеся в коллекции банка культур клеток НИИПББ, к которым относятся линии перевиваемых клеток ВНК-21, MARC-145, MA-104, Vero, СПЭВ, РК-15, РК-13 ПЩ, MDCK, и первичной культуры клеток ТЯ – тестикулы ягнят. Установлено, что из 11 испытанных видов культур клеток наиболее чувствительными к вирусу SARS-CoV-2 были культуры клеток обезьян (MA-104, MARC-145, Vero-WHO) и свиней (РК-15, СПЭВ), в которых вирус активно репродуцировался с увеличением биологической активности в последовательных пассажах. Культуры клеток MDCK, РК-13, ТЯ, CRFK, ВНК-21, ПЩ были не чувствительны к вирусу SARS-CoV-2. Полученные нами данные за исключением некоторой части, подтверждают результаты исследований, полученные в КНР [33]. Разницу в результатах составляют данные о чувствительности клеток кошачьего (CRFK), и кроличьего (РК-13) происхождения. В наших исследованиях эти линии клеток не обладали чувствительностью к вирусу, тогда как китайские исследователи утверждают об обратном

[33]. Следует отметить, что китайские ученые оценивали репликацию вируса в культурах клеток выявлением генома вируса с помощью ПЦР и жизнеспособности культуры клеток с помощью CellTiterGlo (Promega, Мэдисон, Висконсин, США), без учета развития ЦПД, которые, по нашему мнению, не полностью подтверждает чувствительность этих культур клеток к вирусу. Кроме того, в доступных литературах приведены результаты чувствительности клетки человеческого происхождения, а также в клетках летучих мышах по отношению вирусов SARS-CoV и SARS-CoV-2 с целью установления хозяина происхождения.

Поиск информации в доступных открытых источниках показал об отсутствии данных по получению аттенуированного вируса путем серийного пассирования в культуре клеток, за исключением изучения иммуногенности и безопасности аттенуированного штамма, полученного методом селекции негативных бляшек [34]. Так, группа исследователей получила аттенуированный вариант вируса SARS-CoV-2, называемый Del-mut, который содержит делецию в соединении S1/S2. Полученный ими аттенуированный мутантный вариант вызывал легкую форму заболевания у хомяков не снижающий вес животного, демонстрируя более низкие уровни репликации вируса в легких, и являлся стабильным при длительном пассировании в клетках Vero-E6. Однако, отсутствуют данные до какого пассажа аттенуированный вирус был стабильным. В случае доступности этих данных многое можно было бы распознать касательно генотипических признаков аттенуированного или исходного вируса, проводя сравнительный анализ с нашими результатами. Тем не менее, мы хотели обратить особое внимание на фенотипические признаки вируса при заражении культуры клеток Vero. Так, нами выделенный вирус до 10 пассажа не вызывал гибель зараженных клеток, но зараженные клетки отслаивались от стекла культуральных сосудов теряя свои адгезивные свойства. После 10 пассажа вирус постепенно адаптировался к культуре клеток, сокращая сроки культивирования до 48 ч. и вызывая гибель клеток до 40-50 %. Ближе к 30 пассажу вирус полностью адаптировался к культуре и вызывал гибель 80-90% клеток, сокращая срок культивирования до 36 ч. С точки зрения медицины, данный факт возможно даст понять, в основном при изучении патогенеза вируса в организмах человека или

для правильного подбора противовирусных препаратов при лечении данной инфекции.

В исследовательской работе определенное значение имеет устойчивость возбудителя болезни к разным манипуляциям, в процессе которой он подвергается воздействию различных физико-химических факторов. Влияние условий хранения образцов нуклеиновых кислот вируса SARS-CoV-2 [35, 36], а также влияние условий окружающей среды (температура, относительная и абсолютная влажность, солнечный свет) к самому вирусу SARS-CoV-2 приведены в обзорном виде [37]. Исходя из такой ситуации, нами изучалось влияние замораживания и размораживания на сохранность вируса в репродуктивном состоянии. Paggiaro и др. [38], анализируя результаты других исследователей в своем литературном обзоре предполагают, что замораживание и оттаивание не влияет на инфекционный титр коронавируса. Однако, результаты проведенных нами исследований показали, что процесс замораживания при температуре минус 70°C и размораживания при комнатной температуре (20-22 °C) не оказывает заметного влияния на качественный характер цитопатогенности, но оказывает существенное негативное влияние на сохранность титра вируса. Однократное замораживание и размораживание в использованном режиме снижает репродуктивный титр вируса в культуральной суспензии на 0,50 – 0,75 lgТЦД₅₀, который в пересчете на общее количество вирусных частиц составляет от 68 до 82 %.

Изучение условия хранения вирусных суспензий, используемых при проведении различных исследовательских работ и производство биопрепаратов имеет важное значение. Так как, работая с живым вирусом SARS-CoV-2 в лаборатории, мы неожиданно столкнулись с интересной ситуацией. При постановке реакции нейтрализации нами использованный контрольный вирус не вызывал цитопатические действия в культуре клеток. Данный вирус хранился при температуре 4 °C в течение 18 часов перед постановкой реакции. В связи с этим, мы решили изучить сохраняемость вируса SARS-CoV-2 при различных температурных режимах в виде суспензии. Анализируя результаты нашего эксперимента, мы пришли к следующему выводу. Так, во время любой работы или эксперименте с живым вирусом при температурах 37 °C, 22 °C и 4 °C отрицательно влияет на инфекционную активность вируса. Поэтому для того чтобы сохра-

нить жизнеспособность вируса, мы рекомендуем использовать белковые стабилизаторы, такие как бычьи сыворотки в качестве протектора.

Аналогичная работа была проведена другими исследователями, в результате которой была установлена, что вирус SARS-CoV-2 сохраняется в течение 14, 7 и 1 день среде DMEM при температурах 4 °C, 22 °C и 37 °C, соответственно. Когда температура была повышена до 56 °C и 70 °C, время сохранения инфекционного титра резко сократилось до 10 и 1 мин соответственно [39]. Ряд исследователей изучали стабильность вируса SARS-CoV-1 при вышеуказанных температурах [40, 41, 42], в результатах которых сохранялся вирус от 30 мин до 2 часов в зависимости от температуры хранения. Следует отметить, что Rabenau et al. [42] показали, что добавление 20% сыворотки КРС к вирусной суспензии благоприятно влияет на сохраняемость инфекционного титра вируса SARS-CoV-1 при 4 °C и 56 °C. Снижение инфекционности вируса из-за повышения температуры также было отмечено для коронавирусов животных, таких как коронавирус мыши (MCoV или MHV) и коронавирус собак (CCoV) в среде MEM, а также для вируса TGEV в буфере NEPES [43, 44].

Данные о влиянии химических факторов при работе с возбудителями болезней необходимы для создания условий биологической безопасности для персонала и окружающей среды, а также конструирования технологий изготовления биологических препаратов диагностического и профилактического назначения. Анализ литературных источников показали, что для инактивации вирусов Sars-CoV и Sars-CoV-2 испытаны различные химические агенты такие как, глутаральдегид, бета пропиолактон, метанол, пара формальдегид, формальдегид, додецилсульфат натрия, тризол, Triton X-100, Tween 20 или NP-40 [41, 42, 45, 46, 47] и др. В данном исследовании нами изучено влияние формальдегида к вирусу, так как формалин (разбавленный формальдегид) успешно использовался для инактивации вирусов в течение нескольких лет при приготовлении противовирусных вакцин [48 – 54]. Он также использовался в качестве агента фиксации клеток и тканей. Кроме того, формалин является не дорогим, легкодоступным химическим агентом, который можно использовать в научных и производственных целях. Нашей целью не является детальное изучение вирулицидных свойств формальдегида, а изучение и разработка протокола инактивации вируса Sars-CoV-2, который будет

полезен для приготовления инактивированной вакцины против данной болезни.

В наших исследованиях обработка 0,1% и 0,05% растворами формальдегида при температурах 37 °C и 22 °C эффективно повлияет на инфекционность вируса Sars-CoV-2, тогда как инактивация вируса при 4°C с использованием указанных концентраций происходит медленнее и более длительное. Полученные результаты показывают, что инактивация вируса Sars-CoV-2 с помощью формалина зависит от концентрации формалина, температуры реакции, времени инкубации. В других исследованиях подтверждено, что формалин может изменить антигенную структуру вириона [55, 56]. Было показано, что инактивация формалина изменяет антигенные свойства и снижает иммуногенность вакцин, таких как вирус гепатита А и В, вирус полиомиелита, вирус герпеса крупного рогатого скота и вирус гриппа на моделях мышей [57 – 61]. В наших экспериментах вирус сохранил свою морфологическую целостность при просмотре электронной микроскопии после обработки его формальдегидом и формировали иммунитет у вакцинированных хомяков (результаты не показаны). При определении полноты инактивации инактивированной суспензии в клетках Vero показали полную инактивацию вируса, где при трехкратном пассировании не наблюдалось каких-либо изменений (отсутствие ЦПД вируса в культуре клеток) как в контрольных, так и в инфицированных клетках, что подтверждает авирулентность тестируемых проб.

Таким образом, нами проведенные исследования относятся к классической вирусологии, которая является основой современной вирусологии. Поэтому ее необходимо развивать вместе с современной молекулярной вирусологией. Изучение нового вируса Sars-CoV-2, приведшего к глобальной пандемии, носит в основном молекулярный характер и фокусируется на происхождении вируса путем изучения его генома. Следовательно, физические, химические и биологические свойства вируса изучены недостаточно. Результаты исследований в этой области, как мы видели из нашего исследования, часто противоречивы. Это может быть связано с тем, что классическая вирусология сложна, трудоемкая и занимает много времени. Однако мы считаем, что классическая вирусология позволяет разрабатывать протоколы лечения, определять патогенез заболевания и проводить другие но-

вые исследования, позволяя полностью изучить эти свойства вируса.

Конфликт интересов

Все авторы прочитали и ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов.

Источник финансирования

Работа была выполнена в рамках научно-технической программы на тему: «Разработка вакцины против коронавирусной инфекции COVID-19» (ИРН № 64356/ПЦФ-МОН-РК-

ОТ-20) по целевому финансированию на 2020 – 2022 гг. при поддержке Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Благодарности

Выражаем старшему научному сотруднику лаборатории «Молекулярной биологии и геномной инженерии» Кожабергенову Нурлану Сиязбековичу за предоставление электронной фотографии вируса SARS-CoV-2, а также сотрудникам НИИПББ которые принимали непосредственное участие в экспериментах приводившихся в данной статье.

Литература

- 1 Lau, S.K.P., Chan, J.F.W. Coronaviruses: emerging and re-emerging pathogens in humans and animals.// *Virol J* 2015. vol. 31,4 1-13. doi.org/10.1186/s12985-015-0432-z
- 2 To KK, Hung IF, Chan JF, Yuen KY. From SARS coronavirus to novel animal and human coronaviruses.// *J Thorac Dis* 2013. vol. 90,4 1910-7. doi:10.1128/JVI.02685-15.
- 3 Weiss, Susan R, and Sonia Navas-Martin. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus.//*Microbiology and molecular biology reviews* 2005. vol. 69,4. 635-64. doi:10.1128/MMBR.69.4.635-664.2005
- 4 Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A., Zhou, J., Liu, W., Bi, Y., & Gao, G. F. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses.//*Trends Microbiol* 2016. vol. 24,6. 490-502. doi:10.1016/j.tim.2016.03.003
- 5 Lim YX, Ng YL, Tam JP, Liu DX. Human Coronaviruses: A Review of Virus-Host Interactions.// *Diseases*. 2016. vol. 4,3 26. 25 doi:10.3390/diseases4030026.
- 6 Ye ZW, Yuan S, Yuen KS, Fung SY, Chan CP, Jin DY. Zoonotic origins of human coronaviruses.// *Int J Biol Sci* 2020. vol.16(10):1686-1697. doi:10.7150/ijbs.45472.
- 7 Mackenzie JS, Smith DW. COVID-19: a novel zoonotic disease caused by a coronavirus from China: what we know and what we don't [published online ahead of print, 2020 Mar 17].// *Microbiol Aust*. 2020. MA20013. doi:10.1071/MA20013
- 8 Maukayeva, S., Karimova, S.. Epidemiologic character of COVID-19 in Kazakhstan: A preliminary report.//*Northern clinics of Istanbul* 2020. vol.7(3), 210–213. https://doi.org/10.14744/nci.2020.62443
- 9 Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2.// *Nat Med*. 2020. vol. 26,4: 450-452. doi: 10.1038/s41591-020-0820-9.
- 10 Shu-Miaw Chaw, Jui-Hung Tai, Shi-Lun Chen, Chia-Hung Hsieh, Sui-Yuan Chang, Shiou-Hwei Yeh, Wei-Shiung Yang, Pei-Jer Chen, Hurng-Yi Wang. The origin and underlying driving forces of the SARS-CoV-2 outbreak.//*J Biomed Sci* 2020. vol. 27-73. doi.org/10.1186/s12929-020-00665-8
- 11 Malaiyan, J, Arumugam, S, Mohan, K, Gomathi Radhakrishnan, G. An update on the origin of SARS-CoV-2: Despite closest identity, bat (RaTG13) and pangolin derived coronaviruses varied in the critical binding site and O-linked glycan residues.//*J Med Virol*. 2020. vol.1– 7. https://doi.org/10.1002/jmv.26261
- 12 Mercatelli D., Giorgi F.M. Geographic and Genomic Distribution of SARS-CoV-2 Mutations. //*Frontiers in Microbiology* 2020. vol..11., P.1800 https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01800
- 13 Tang, X., Wu, C., Li, X., Song, Y., Yao, X., Wu, X., Duan, Y., Zhang, H., Wang, Y., Qian, Z., Cui, J., & Lu, J.. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2.//*National Science Review* 2020. nwa036. https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa036
- 14 Kaur, N., Singh, R., Dar, Z., Bijarnia, R. K., Dhingra, N., & Kaur, T.. Genetic comparison among various coronavirus strains for the identification of potential vaccine targets of SARS-CoV2.//*Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 2020. vol. 89 (2021): 104490. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104490
- 15 Xiaolu Tang, Changcheng Wu, Xiang Li, Yuhe Song, Xinmin Yao, Xinkai Wu, Yuange Duan, Hong Zhang, Yirong Wang, Zhaohui Qian, Jie Cui, Jian Lu, On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. //*National Science Review* 2020. vol. 7. 1012–1023 doi.org/10.1093/nsr/nwaa036
- 16 Wang, H., Li, X., Li, T., Zhang, S., Wang, L., Wu, X., & Liu, J. The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2.//*European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 2020.vol.39(9), 1629–1635. doi.org/10.1007/s10096-020-03899-4

- 17 Junejo, Y., Ozaslan, M., Safdar, M., Khailany, R. A., Rehman, S., Yousaf, W., & Khan, M. A.. Novel SARS-CoV-2/COVID-19: Origin, pathogenesis, genes and genetic variations, immune responses and phylogenetic analysis. // *Gene reports* 2020. 20, 100752. doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100752
- 18 Islam, M.R., Hoque, M.N., Rahman, M.S., Alam, A., Akther, M., Puspo, J. A., Akter, S., Sultana, M., Crandall, K.A., & Hossain, M.A.. Genome-wide analysis of SARS-CoV-2 virus strains circulating worldwide implicates heterogeneity. // *Sci Rep* 2020. 10, 14004 . doi.org/10.1038/s41598-020-70812-6
- 19 V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V.. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. // *Nat Rev Microbiol* 2020. 19(3), 155–170. doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6
- 20 Scheller, C., Krebs, F., Minkner, R., Astner, I., Gil-Moles, M., & Wätzig, H.. Physicochemical properties of SARS-CoV-2 for drug targeting, virus inactivation and attenuation, vaccine formulation and quality control. // *Electrophoresis* 2020. 41(13-14), 1137–1151. doi.org/10.1002/elps.202000121
- 21 Shi, J., Wen, Z., Zhong, G., Yang, H., Wang, C., Huang, B., Liu, R., He, X., Shuai, L., Sun, Z., Zhao, Y., Liu, P., Liang, L., Cui, P., Wang, J., Zhang, X., Guan, Y., Tan, W., Wu, G., Chen, H., Bu, Z.. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. // *Science (New York.)* 2020. 368(6494), 1016–1020. doi.org/10.1126/science.abb7015
- 22 Sia SF, Yan LM, Chin AWH, Fung K, Choy KT, Wong AYL, Kaewpreedee P, Perera RAPM, Poon LLM, Nicholls JM, Peiris M, Yen HL. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. // *Nature*. 2020. 583(7818):834-838. doi: 10.1038/s41586-020-2342-5.
- 23 Harrison A.G., Lin T. and Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. // *Trends in Immunology* 2020. Vol. 41, No. 12 doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004
- 24 Khalaf K, Papp N, Chou JT-T, Hana D, Mackiewicz A and Kaczmarek M. SARS-CoV-2: Pathogenesis, and Advancements in Diagnostics and Treatment. // *Front. Immunol* 2020. 11:570927. doi: 10.3389/fimmu.2020.570927
- 25 WHO/WHE/CPI/2019.20 Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2019– 2020. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325884/WHO-WHE-CPI-2019.20-eng.pdf?ua=1>
- 26 WHO Laboratory biosafety guidance related to the novel coronavirus (2019-nCoV). https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/laboratory-biosafety-novel-coronavirus-version-1-1.pdf?sfvrsn=912a9847_2
- 27 Санитарно-эпидемиологические требования к лабораториям, использующим потенциально опасные химические и биологические вещества. Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 8 сентября 2017 года № 684
- 28 Reed, L. J. & Muench, H. A Simple Method Of Estimating Fifty Per Cent Endpoints. // *American Journal of Epidemiology* 1938. 27, 493–497, doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.
- 29 Corman Victor M, Landt Olfert, Kaiser Marco, Molenkamp Richard, Meijer Adam, Chu Daniel KW, Bleicker Tobias, Brünink Sebastian, Schneider Julia, Schmidt Marie Luisa, Mulders Daphne GJC, Haagmans Bart L, van der Veer Bas, van den Brink Sharon, Wijsman Lisa, Goderski Gabriel, Romette Jean-Louis, Ellis Joanna, Zambon Maria, Peiris Malik, Goossens Herman, Reusken Chantal, Koopmans Marion PG, Drosten Christian. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. // *Euro Surveill*. 2020. 25(3):pii=2000045. doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045
- 30 Yao P, Zhang Y, Sun Y, Gu Y, Xu F, Su B, Chen C, Lu H, Wang D, Yang Z, Niu B, Chen J, Xie L, Chen L, Zhang Y, Wang H, Zhao Y, Guo Y, Ruan J, Zhu Z, Fu Z, Tian D, An Q, Jiang J, Zhu H. Isolation and Growth Characteristics of SARS-CoV-2 in Vero Cell. // *Virology*. 2020. 35(3):348-350. doi:10.1007/s12250-020-00241-2.
- 31 Kumar, S., Nyodu, R., Maurya, V. K., & Saxena, S. K.. Morphology, Genome Organization, Replication, and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) //Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Therapeutics* 2020. 23–31. doi.org/10.1007/978-981-15-4814-7_3
- 32 Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, Wang W, Song H, Huang B, Zhu N, Bi Y, Ma X, Zhan F, Wang L, Hu T, Zhou H, Hu Z, Zhou W, Zhao L, Chen J, Meng Y, Wang J, Lin Y, Yuan J, Xie Z, Ma J, Liu WJ, Wang D, Xu W, Holmes EC, Gao GF, Wu G, Chen W, Shi W, Tan W. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. // *Lancet*. 2020. vol. 22;395(10224):565-574. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
- 33 Chu H., Chan J.F., Yuen T.T, Shuai H., Yuan Sh, Wang Y., Hu B., Yip C.C, Tsang J.O., Huang X., Chai Y., Yang D., Hou Y., Chik K.K, Zhang X., Fung A.Y., Tsoi H., Cai J., Chan W., Ip J.D, Chu A.W, Zhou J., Lung D.Ch, Kok K., To K.K., Tsang O.T., Chan K.H., Yuen K. Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study // *The Lancet Microbe* 2020.2666-5247. doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30004-5.
- 34 Lau SY, Wang P, Mok BW, Zhang AJ, Chu H, Lee AC, Deng S, Chen P, Chan KH, Song W, Chen Z, To KK, Chan JF, Yuen KY, Chen H. Attenuated SARS-CoV-2 variants with deletions at the S1/S2 junction. // *Emerg Microbes Infect.* 2020. vol. 9(1). 837-842. doi: 10.1080/22221751.2020.1756700.
- 35 Li, L., Li, X., Guo, Z., Wang, Z., Zhang, K., Li, C., Wang, C., & Zhang, S.. Influence of Storage Conditions on SARS-CoV-2 Nucleic Acid Detection in Throat Swabs. // *The Journal of infectious diseases* 2020, vol.222(2). 203–205. doi.org/10.1093/infdis/jiaa272
- 36 Garrett A. Perchetti, Meei-Li Huang, Vikas Peddu, Keith R. Jerome, Alexander L. Greninger Stability of SARS-CoV-2 in Phosphate-Buffered Saline for Molecular Detection. // *Journal of Clinical Microbiology* 2020. vol. 58 (8) e01094-20; doi.org/10.1128/JCM.01094-20
- 37 Aboubakr, H. A., Sharafeldin, T. A., & Goyal, S. M.. Stability of SARS-CoV-2 and other coronaviruses in the environment and on common touch surfaces and the influence of climatic conditions: A review. // *Transboundary and emerging diseases* 2020, 10.1111/tbed.13707. Advance online publication. doi.org/10.1111/tbed.13707

- 38 Paggiaro AO, Carvalho VF, Gemperli R. Effect of different human tissue processing techniques on SARS-CoV-2 inactivation-review. // *Cell Tissue Bank* 2021. vol. 22(1):1-10. doi:10.1007/s10561-020-09869-6.
- 39 Chin AWH, Chu JTS, Perera MRA, Hui KPY, Yen HL, Chan MCW, Peiris M, Poon LLM. Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. // *Lancet Microbe*. 2020. vol.1(1):e10. doi:10.1016/S2666-5247(20)30003-3.
- 40 Duan SM, Zhao XS, Wen RF, Huang JJ, Pi GH, Zhang SX, Han J, Bi SL, Ruan L, Dong XP; SARS Research Team. Stability of SARS coronavirus in human specimens and environment and its sensitivity to heating and UV irradiation. // *Biomed Environ Sci*. 2003. vol.16(3):246-55. PMID:14631830.
- 41 Darnell ME, Subbarao K, Feinstone SM, Taylor DR. Inactivation of the coronavirus that induces severe acute respiratory syndrome, SARS-CoV. *J Virol Methods*. 2004 Oct;121(1):85-91. doi: 10.1016/j.jviromet.2004.06.006. PMID: 15350737; PMCID: PMC7112912.
- 42 Rabenau HF, Cinatl J, Morgenstern B, Bauer G, Preiser W, Doerr HW. Stability and inactivation of SARS coronavirus. // *Med Microbiol Immunol*. 2005. vol. 194(1-2):1-6. doi: 10.1007/s00430-004-0219-0
- 43 Laude H. Thermal inactivation studies of a coronavirus, transmissible gastroenteritis virus. // *J Gen Virol*. 1981. vol.;56(Pt 2):235-40. doi: 10.1099/0022-1317-56-2-235.
- 44 Saknimit M, Inatsuki I, Sugiyama Y, Yagami K. Virucidal efficacy of physico-chemical treatments against coronaviruses and parvoviruses of laboratory animals. // *Jikken Dobutsu*. 1988 vol.37(3):341-5. doi: 10.1538/expanim1978.37.3_341.
- 45 Jureka, A. S., Silvas, J. A., & Basler, C. F.. Propagation, Inactivation, and Safety Testing of SARS-CoV-2. // *Viruses* 2020. vol.12(6), 622. doi.org/10.3390/v12060622
- 46 Edward I Patterson, Tessa Prince, Enyia R Anderson, Aitor Casas-Sanchez, Shirley L Smith, Cintia Cansado-Utrilla, Tom Solomon, Michael J Griffiths, Álvaro Acosta-Serrano, Lance Turtle, Grant L Hughes, Methods of Inactivation of SARS-CoV-2 for Downstream Biological Assays. // *The Journal of Infectious Diseases* 2020. vol. 222. 1462–1467. doi.org/10.1093/infdis/jiaa507
- 47 Welch SR, Davies KA, Buczkowski H, Hettiarachchi N, Green N, Arnold U, Jones M, Hannah MJ, Evans R, Burton C, Burton JE, Guiver M, Cane PA, Woodford N, Bruce CB, Roberts ADG, Killip MJ. Analysis of inactivation of SARS-CoV-2 by specimen transport media, nucleic acid extraction reagents, detergents, and fixatives. // *J Clin Microbiol* 2020. 58:e01713-20. doi.org/10.1128/JCM.01713-20.
- 48 Delrue I, Verzele D, Madder A, Nauwynck HJ. Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges. // *Expert Rev Vaccines*. 2012. vol.11(6):695-719. doi:10.1586/erv.12.38.
- 49 Schiøler KL, Samuel M, Wai KL. Vaccines for preventing Japanese encephalitis. // *Cochrane Database Syst Rev*. 2007. (3):CD004263. doi:10.1002/14651858.
- 50 Takada A, Matsushita S, Ninomiya A, Kawaoka Y, Kida H. Intranasal immunization with formalin-inactivated virus vaccine induces a broad spectrum of heterosubtypic immunity against influenza A virus infection in mice. // *Vaccine* 2003. vol.4;21(23):3212-8. doi:10.1016/s0264-410x(03)00234-2.
- 51 Werzberger, A., Mensch, B., Kuter, B., Brown, L., Lewis, J., Sitrin, R., Miller, W., Shouval, D., Wiens, B., & Calandra, G. . A controlled trial of a formalin-inactivated hepatitis A vaccine in healthy children. // *N Engl J Med*. 1992. 13;327(7):453-7. doi: 10.1056/NEJM199208133270702.
- 52 Murphey-Corb, M., Martin, L. N., Davison-Fairburn, B., Montelaro, R. C., Miller, M., West, M., Ohkawa, S., Baskin, G. B., Zhang, J. Y., & Putney, S. D. A formalin-inactivated whole SIV vaccine confers protection in macaques. // *Science*. 1989. vol.8;246(4935):1293-7. doi:10.1126/science.2555923.
- 53 Ogra PL, Ogra SS. Local antibody response to poliovaccine in the human female genital tract. // *J Immunol* 1973. vol.110(5):1307-11. PMID: 4633297.
- 54 Kissling RE, Reese DR. Anti-Rabies Vaccine of Tissue Culture Origin. // *J Immunol* 1963. vol.91: 362–368. pmid:14071026
- 55 Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. // *Vet Pathol*. 2005. vol.42(4):405-26. doi:10.1354/vp.42-4-405.
- 56 Metz B, Kersten GF, Hoogerhout P, Brugghe HF, Timmermans HA, de Jong A, Meiring H, ten Hove J, Hennink WE, Crommelin DJ, Jiskoot W. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with model peptides. *J Biol Chem*. 2004 Feb 20;279(8):6235-43. doi: 10.1074/jbc.M310752200.
- 57 Furuya Y, Regner M, Lobigs M, Koskinen A, Müllbacher A, Alsharifi M. Effect of inactivation method on the cross-protective immunity induced by whole 'killed' influenza A viruses and commercial vaccine preparations. // *J Gen Virol*. 2010/ vol.91(Pt 6):1450-60. doi:10.1099/vir.0.018168-0.
- 58 Tano Y, Shimizu H, Martin J, Nishimura Y, Simizu B, Miyamura T. Antigenic characterization of a formalin-inactivated poliovirus vaccine derived from live-attenuated Sabin strains. // *Vaccine*. 2007. vol. 10;25(41):7041-6. doi:10.1016/j.vaccine.2007.07.060.
- 59 Duque H, Marshall RL, Israel BA, Letchworth GJ. Effects of formalin inactivation on bovine herpes virus-1 glycoproteins and antibody response elicited by formalin-inactivated vaccines in rabbits. // *Vaccine* 1989. vol.7: 513–520. pmid:2481909
- 60 Peterson DL, Paul DA, Lam J, Tribby II, Achord DT. Antigenic structure of hepatitis B surface antigen: identification of the "d" subtype determinant by chemical modification and use of monoclonal antibodies. // *J Immunol* 1984. vol.132: 920–927.
- 61 Wilton T, Dunn G, Eastwood D, Minor PD, Martin J. Effect of formaldehyde inactivation on poliovirus. // *J Virol*. 2014. vol;88(20):11955-64. doi: 10.1128/JVI.01809-14.

References

- 1 Aboubakr, H. A., Sharafeldin, T. A., & Goyal, S. M. (2020). Stability of SARS-CoV-2 and other coronaviruses in the environment and on common touch surfaces and the influence of climatic conditions: A review. *Transboundary and emerging diseases*, 10.1111/tbed.13707. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/tbed.13707>
- 2 Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF (2020). The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med*. vol. 26,4: 450-452. doi: 10.1038/s41591-020-0820-9.
- 3 Chin A.W.H., Chu J.T.S., Perera M.R.A., Hui K.P.Y., Yen H.-L., Chan M.C.W., Poon L.L.M. (2020). Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. *The Lancet Microbe*, 10.1016/S2666-5247(20)30003-3.
- 4 Chu H., Chan J.F., Yuen T.T., Shuai H., Yuan Sh, Wang Y., Hu B., Yip C.C, Tsang J.O., Huang X., Chai Y., Yang D., Hou Y., Chik K.K, Zhang X., Fung A.Y., Tsoi H., Cai J., Chan W., Ip J.D, Chu A.W, Zhou J., Lung D.Ch, Kok K., To K.K., Tsang O.T., Chan K.H., Yuen K (2020). Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study *The Lancet Microbe*.2666-5247. doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30004-5.
- 5 Corman Victor M, Landt Olfert, Kaiser Marco, Molenkamp Richard, Meijer Adam, Chu Daniel KW, Bleicker Tobias, Brünink Sebastian, Schneider Julia, Schmidt Marie Luisa, Mulders Daphne GJC, Haagmans Bart L, van der Veer Bas, van den Brink Sharon, Wijsman Lisa, Goderski Gabriel, Romette Jean-Louis, Ellis Joanna, Zambon Maria, Peiris Malik, Goossens Herman, Reuske Chantal, Koopmans Marion PG, Drosten Christian (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*. 25(3):pii=2000045. doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045
- 6 Darnell M.E., Subbarao K., Feinstone S.M., & Taylor D.R. (2004). Inactivation of the coronavirus that induces severe acute respiratory syndrome, SARS-CoV. *Journal of Virological Methods*, 121(1), 85–91. 10.1016/j.jviromet.2004.06.006
- 7 Duan S.M., Zhao, X.S., Wen R.F., Huang J.J., Pi G.H., Zhang S.X. SARS Research Team. (2003). Stability of SARS coronavirus in human specimens and environment and its sensitivity to heating and UV irradiation. *Biomedical and Environmental Sciences: BES*, 16(3), 246.
- 8 Duque H, Marshall RL, Israel BA, Letchworth GJ (1989) Effects of formalin inactivation on bovine herpes virus-1 glycoproteins and antibody response elicited by formalin-inactivated vaccines in rabbits. *Vaccine* 7: 513–520. pmid:2481909
- 9 Edward I Patterson, Tessa Prince, Enyia R Anderson, Aitor Casas-Sanchez, Shirley L Smith, Cintia Cansado-Utrilla, Tom Solomon, Michael J Griffiths, Álvaro Acosta-Serrano, Lance Turtle, Grant L Hughes (2020). Methods of Inactivation of SARS-CoV-2 for Downstream Biological Assays. *The Journal of Infectious Diseases*. vol. 222. 1462–1467. doi.org/10.1093/infdis/jiaa507
- 10 Furuya Y, Regner M, Lobigs M, Koskinen A, Mullbacher A, et al. (2010) Effect of inactivation method on the cross-protective immunity induced by whole 'killed' influenza A viruses and commercial vaccine preparations. *J Gen Virol* 91: 1450–1460. pmid:20147516
- 11 Garrett A. Perchetti, Meei-Li Huang, Vikas Peddu, Keith R. Jerome, Alexander L(2020). Greninger Stability of SARS-CoV-2 in Phosphate-Buffered Saline for Molecular Detection. *Journal of Clinical Microbiology*. vol. 58 (8) e01094-20; doi.org/10.1128/JCM.01094-20
- 12 Harrison A.G., Lin T. and Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. //Trends in Immunology 2020. Vol. 41, No. 12 doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004
- 13 Iris Delrue, Dieter Verzele, Annemieke Madder & Hans J Nauwynck (2012) Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges, *Expert Review of Vaccines*, 11:6, 695-719, DOI: 10.1586/erv.12.38
- 14 Islam, M. R., Hoque, M. N., Rahman, M. S., Alam, A., Akther, M., Puspo, J. A., Akter, S., Sultana, M., Crandall, K. A., & Hossain, M. A. (2020). Genome-wide analysis of SARS-CoV-2 virus strains circulating worldwide implicates heterogeneity. *Sci Rep* . 10, 14004 . doi.org/10.1038/s41598-020-70812-6
- 15 Junejo, Y., Ozaslan, M., Safdar, M., Khailany, R. A., Rehman, S., Yousaf, W., & Khan, M. A. (2020). Novel SARS-CoV-2/COVID-19: Origin, pathogenesis, genes and genetic variations, immune responses and phylogenetic analysis. *Gene reports*, 20, 100752. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100752>
- 16 Jureka, A. S., Silvas, J. A., & Basler, C. F. (2020). Propagation, Inactivation, and Safety Testing of SARS-CoV-2. *Viruses*, 12(6), 622. <https://doi.org/10.3390/v12060622>
- 17 Kaur, N., Singh, R., Dar, Z., Bijarnia, R. K., Dhingra, N., & Kaur, T. (2020). Genetic comparison among various coronavirus strains for the identification of potential vaccine targets of SARS-CoV2. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 104490. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104490>
- 18 Khalaf K, Papp N, Chou JT-T, Hana D, Mackiewicz A and Kaczmarek M (2020) SARS-CoV-2: Pathogenesis, and Advancements in Diagnostics and Treatment. *Front. Immunol*. 11:570927. doi: 10.3389/fimmu.2020.570927
- 19 Kissling RE, Reese DR (1963) Anti-Rabies Vaccine of Tissue Culture Origin. *J Immunol* 91: 362–368. pmid:14071026
- 20 Kumar, S., Nyodu, R., Maurya, V. K., & Saxena, S. K. (2020). Morphology, Genome Organization, Replication, and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Therapeutics* , 23–31. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4814-7_3
- 21 Lau, S.K.P., Chan, J.F.W (2015). Coronaviruses: emerging and re-emerging pathogens in humans and animals. *Virol J* . vol. 31,4 1-13. doi.org/10.1186/s12985-015-0432-z
- 22 Lau SY, Wang P, Mok BW, Zhang AJ, Chu H, Lee AC, Deng S, Chen P, Chan KH, Song W, Chen Z, To KK, Chan JF, Yuen KY, Chen H (2020). Attenuated SARS-CoV-2 variants with deletions at the S1/S2 junction. *Emerg Microbes Infect*. vol. 9(1). 837-842. doi: 10.1080/22221751.2020.1756700.

- 23 Laude, H. (1981). Thermal inactivation studies of a coronavirus, transmissible gastroenteritis virus. *Journal of General Virology*, 56(2), 235–240. 10.1099/0022-1317-56-2-235
- 24 Lim YX, Ng YL, Tam JP, Liu DX (2016). Human Coronaviruses: A Review of Virus-Host Interactions. *Diseases*. vol. 4,3 26. 25 doi:10.3390/diseases4030026.
- 25 Li, L., Li, X., Guo, Z., Wang, Z., Zhang, K., Li, C., Wang, C., & Zhang, S. (2020). Influence of Storage Conditions on SARS-CoV-2 Nucleic Acid Detection in Throat Swabs. *The Journal of infectious diseases*, 222(2), 203–205. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa272>
- 26 Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, Wang W, Song H, Huang B, Zhu N, Bi Y, Ma X, Zhan F, Wang L, Hu T, Zhou H, Hu Z, Zhou W, Zhao L, Chen J, Meng Y, Wang J, Lin Y, Yuan J, Xie Z, Ma J, Liu WJ, Wang D, Xu W, Holmes EC, Gao GF, Wu G, Chen W, Shi W, Tan W (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. vol. 22;395(10224):565-574. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
- 27 Mackenzie JS, Smith DW (2020). COVID-19: a novel zoonotic disease caused by a coronavirus from China: what we know and what we don't. *Microbiol Aust*. MA20013. doi:10.1071/MA20013
- 28 Maukayeva, S., & Karimova, S. (2020). Epidemiologic character of COVID-19 in Kazakhstan: A preliminary report. *Northern clinics of Istanbul*, 7(3), 210–213. <https://doi.org/10.14744/nci.2020.62443>
- 29 Malaiyan, J, Arumugam, S, Mohan, K, Gomathi Radhakrishnan, G (2020). An update on the origin of SARS-CoV-2: Despite closest identity, bat (RaTG13) and pangolin derived coronaviruses varied in the critical binding site and O-linked glycan residues. *J Med Virol*. . vol.1– 7. <https://doi.org/10.1002/jmv.26261>
- 30 Mercatelli D., Giorgi F.M (2020). Geographic and Genomic Distribution of SARS-CoV-2 Mutations. *Frontiers in Microbiology*. vol.11,. P.1800 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01800>
- 31 Metz B, Kersten GF, Hoogerhout P, Brughe HF, Timmermans HA, et al. (2004) Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with model peptides. *J Biol Chem* 279: 6235–6243. pmid:14638685
- 32 Murphey-Corb M, Martin LN, Davison-Fairburn B, Montelaro RC, Miller M, et al. (1989) A formalin-inactivated whole SIV vaccine confers protection in macaques. *Science* 246: 1293–1297. pmid:2555923
- 33 Ogra PL, Ogra SS (1973) Local antibody response to poliovaccine in the human female genital tract. *J Immunol* 110: 1307–1311. pmid:4633297
- 34 Paggiaro AO, Carvalho VF, Gemperli R (2021). Effect of different human tissue processing techniques on SARS-CoV-2 inactivation-review. *Cell Tissue Bank*. vol. 22(1):1-10. doi:10.1007/s10561-020-09869-6
- 35 Peiris M, Yen HL (2020). Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature*. 583(7818):834-838. doi: 10.1038/s41586-020-2342-5.
- 36 Peterson DL, Paul DA, Lam J, Tribby II, Achord DT (1984) Antigenic structure of hepatitis B surface antigen: identification of the "d" subtype determinant by chemical modification and use of monoclonal antibodies. *J Immunol* 132: 920–927. pmid:6197478
- 37 Rabenau, H. F. , Cinatl, J. , Morgenstern, B. , Bauer, G. , Preiser, W. , & Doerr, H. W. (2005). Stability and inactivation of SARS coronavirus. *Medical Microbiology and Immunology*, 194(1–2), 1–6. 10.1007/s00430-004-0219-0
- 38 Ramos-Vara JA (2005) Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* 42: 405–426. pmid:16006601
- 39 Reed, L. J. & Muench, H. A (1938). Simple Method of Estimating Fifty Per Cent Endpoints. *American Journal of Epidemiology* . 27, 493–497, doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.
- 40 Санитарно-эпидемиологические требования к лабораториям, испол`зующим потенциал`но опасны`е химические и биологические вещества. Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 8 сентября 2017 года № 684 [Sanitary and epidemiological requirements for laboratories using potentially dangerous chemical and biological substances. Order of the Minister of Health of the Republic of Kazakhstan dated September 8, 2017 No. 684]
- 41 Saknimit, M. , Inatsuki, I. , Sugiyama, Y. , & Yagami, K. I. (1988). Virucidal efficacy of physic chemical treatments against coronaviruses and parvoviruses of laboratory animals. *Experimental Animals*, 37(3), 341–345. 10.1538/expanim1978.37.3_341
- 42 Scheller, C., Krebs, F., Minkner, R., Astner, I., Gil-Moles, M., & Wätzig, H. (2020). Physicochemical properties of SARS-CoV-2 for drug targeting, virus inactivation and attenuation, vaccine formulation and quality control. *Electrophoresis*, 41(13-14), 1137–1151. <https://doi.org/10.1002/elps.202000121>
- 43 Schioler KL, Samuel M, Wai KL (2007) Vaccines for preventing Japanese encephalitis. *Cochrane Database Syst Rev*: CD004263. pmid:17636750
- 44 Shi, J., Wen, Z., Zhong, G., Yang, H., Wang, C., Huang, B., Liu, R., He, X., Shuai, L., Sun, Z., Zhao, Y., Liu, P., Liang, L., Cui, P., Wang, J., Zhang, X., Guan, Y., Tan, W., Wu, G., Chen, H., ... Bu, Z. (2020). Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science (New York, N.Y.)*, 368(6494), 1016–1020. <https://doi.org/10.1126/science.abb7015>
- 45 Shu-Miaw Chaw, Jui-Hung Tai, Shi-Lun Chen, Chia-Hung Hsieh, Sui-Yuan Chang, Shiou-Hwei Yeh, Wei-Shiung Yang, Pei-Jer Chen, Hurng-Yi Wang (2020) The origin and underlying driving forces of the SARS-CoV-2 outbreak. *J Biomed Sci*. vol. 27-73. doi.org/10.1186/s12929-020-00665-8
- 46 Sia SF, Yan LM, Chin AWH, Fung K, Choy KT, Wong AYL, Kaewpreedee P, Perera RAPM, Poon LLM, Nicholls JM, WHO/WHE/CPI/2019.20 Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2019– 2020. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325884/WHO-WHE-CPI-2019.20-eng.pdf?ua=1>
- 47 Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A., Zhou, J., Liu, W., Bi, Y., & Gao, G. F (2016). Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. *Trends Microbiol*. vol. 24,6. 490-502. doi:10.1016/j.tim.2016.03.003

- 48 Tang, X., Wu, C., Li, X., Song, Y., Yao, X., Wu, X., Duan, Y., Zhang, H., Wang, Y., Qian, Z., Cui, J., & Lu, J. (2020). On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. *National Science Review*, nwaa036. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa036>
- 49 Tano Y, Shimizu H, Martin J, Nishimura Y, Simizu B, et al. (2007) Antigenic characterization of a formalin-inactivated poliovirus vaccine derived from live-attenuated Sabin strains. *Vaccine* 25: 7041–7046. pmid:17825459
- 50 Takada A, Matsushita S, Ninomiya A, Kawaoka Y, Kida H (2003) Intranasal immunization with formalin-inactivated virus vaccine induces a broad spectrum of heterosubtypic immunity against influenza A virus infection in mice. *Vaccine* 21: 3212–3218. pmid:12804850
- 51 To KK, Hung IF, Chan JF, Yuen KY (2013). From SARS coronavirus to novel animal and human coronaviruses. *J Thorac Dis.* vol. 90,4 1910-7. doi:10.1128/JVI.02685-15.
- 52 V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2020). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* . 19(3), 155–170. doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6
- 53 Wang, Zhaohui Qian, Jie Cui, Jian Lu (2020) , On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. *National Science Review*. vol. 7. 1012–1023 doi.org/10.1093/nsr/nwaa036
- 54 Wang, H., Li, X., Li, T., Zhang, S., Wang, L., Wu, X., & Liu, J. (2020). The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 39(9), 1629–1635. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03899-4>
- 55 Weiss, Susan R, and Sonia Navas-Martin (2005). Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiology and molecular biology reviews*. vol. 69,4. 635-64. doi:10.1128/MMBR.69.4.635-664.2005
- 56 Welch SR, Davies KA, Buczkowski H, Hettiarachchi N, Green N, Arnold U, Jones M, Hannah MJ, Evans R, Burton C, Burton JE, Guiver M, Cane PA, Woodford N, Bruce CB, Roberts ADG, Killip MJ. (2020). Analysis of inactivation of SARS-CoV-2 by specimen transport media, nucleic acid extraction reagents, detergents, and fixatives. *J Clin Microbiol.* 58:e01713-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.01713-20>
- 57 Werzberger A, Mensch B, Kuter B, Brown L, Lewis J, et al. (1992) A controlled trial of a formalin-inactivated hepatitis A vaccine in healthy children. *N Engl J Med* 327: 453–457. pmid:1320740
- 58 Wilton T, Dunn G, Eastwood D, Minor PD, Martin J (2014) Effect of formaldehyde inactivation on poliovirus. *J Virol.* vol:88(20):11955-64. doi: 10.1128/JVI.01809-14
- 59 Xiaolu Tang, Changcheng Wu, Xiang Li, Yuhe Song, Xinmin Yao, Xinkai Wu, Yuange Duan, Hong Zhang, Yirong WHO Laboratory biosafety guidance related to the novel coronavirus (2019-nCoV). https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/laboratory-biosafety-novel-coronavirus-version-1-1.pdf?sfvrsn=912a9847_2
- 60 Yao P, Zhang Y, Sun Y, Gu Y, Xu F, Su B, Chen C, Lu H, Wang D, Yang Z, Niu B, Chen J, Xie L, Chen L, Zhang Y, Wang H, Zhao Y, Guo Y, Ruan J, Zhu Z, Fu Z, Tian D, An Q, Jiang J, Zhu H. (2020). Isolation and Growth Characteristics of SARS-CoV-2 in Vero Cell. *Virol Sin.* 35(3):348-350. doi:10.1007/s12250-020-00241-2.
- 61 Ye ZW, Yuan S, Yuen KS, Fung SY, Chan CP, Jin DY (2020). Zoonotic origins of human coronaviruses. *Int J Biol Sci.* vol.16(10):1686-1697. doi:10.7150/ijbs.45472.