

# ВОЗНИКНОВЕНИЕ НОВЫХ ИНФЕКЦИЙ В XXI ВЕКЕ И СПОСОБЫ ИХ ИДЕНТИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ (NGS)

В. В. Макаров<sup>1✉</sup>, А. В. Хромов<sup>2</sup>, В. А. Гущин<sup>1,3</sup>, А. П. Ткачук<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Отдел физических методов измерения, НИИ физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

<sup>2</sup> Факультет биоинформатики и биоинженерии, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

<sup>3</sup> Лаборатория трансляционной биомедицины, Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, Москва

Каждое новое инфекционное заболевание может быть серьезным вызовом для современной медицины. Изменение окружающей среды, вырубка тропических лесов, таяние льдов в Антарктике, увеличение плотности населения и повсеместное использование антибиотиков — все это факторы, провоцирующие появление новых патогенов. Эпидемии гриппа, вызываемые новыми штаммами вируса; респираторные синдромы, вызываемые новыми коронавирусами; вспышки инфекций, причиной которых является гемолитическая кишечная палочка; возникновение резистентных к антибиотикам супербактерий — примеры того, какие опасности могут поджидать человечество. В число первоочередных мер, которые необходимо предпринять для противодействия новым патогенам, входит разработка способов их быстрой и точной идентификации. В обзоре рассмотрены случаи возникновения в XXI веке новых инфекционных агентов, а также проанализированы возможность и перспективы использования для выявления и идентификации новых патогенов методов высокопроизводительного секвенирования (next generation sequencing).

**Ключевые слова:** инфекционные агенты, патогенные организмы, методы выявления новых патогенов, высокопроизводительное секвенирование, коронавирус, вирус гриппа, горизонтальный перенос генов, антибиотикорезистентность

**Финансирование:** работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, грант № 15-54-04004.

✉ **Для корреспонденции:** Макаров Валентин Владимирович  
ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 40, г. Москва, 119991; makarovvalentine@gmail.com

**Статья получена:** 03.02.2017 **Статья принята к печати:** 08.02.2017

## EMERGENCE OF NEW INFECTIONS IN THE 21<sup>ST</sup> CENTURY AND IDENTIFICATION OF PATHOGENS USING NEXT GENERATION SEQUENCING

Makarov VV<sup>1✉</sup>, Khromov AV<sup>2</sup>, Guschin VA<sup>1,3</sup>, Tkachuk AP<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Physical Measurement Methods, A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>2</sup> The Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Translational Biomedicine Laboratory, N. F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Each new emerging infection may become a big challenge to the medical community. Changing environment, tropical deforestation, melting of the Antarctic ice, growing population density and uncontrolled use of antibiotics provoke emergence and evolution of pathogens. Epidemics caused by new strains of the influenza virus, respiratory syndromes associated with coronaviruses, outbreaks of hemolytic *Escherichia coli* infections and antibiotic-resistant superbacteria are hazards to humans. Among high-priority measures for pathogen control that are yet to be taken is development of fast and accurate techniques for pathogen identification. Our review looks at the cases of new infections registered in the 21<sup>st</sup> century and explores feasibility of next generation sequencing for the detection and identification of new pathogens.

**Keywords:** infectious agents, pathogens, techniques for identification of new pathogens, next generation sequencing, coronavirus, influenza virus, horizontal gene transfer, resistance to antibiotics

**Funding:** this work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, grant no. 15-54-04004.

✉ **Correspondence should be addressed:** Valentin Makarov  
ul. Leninskie gory, d. 1., str. 40, Moscow, Russia, 119991; makarovvalentine@gmail.com

**Received:** 03.02.2017 **Accepted:** 08.02.2017

Вспышки инфекционных заболеваний представляют собой постоянную угрозу для глобального здравоохранения. Обнаружению и изучению новых возбудителей уделяют много внимания, примеры — коронавирус ближневосточного респираторного синдрома, вирус Эбола в Заире или вирус Зика в Южной Америке. Факторы, влияющие на появление новых патогенов, приведены в таблице. Тем не менее значительно чаще эпидемии вызывают известные патогены, такие как полиовирус, грипп или холерный вибрион.

Факторы риска, повышающие вероятность возникновения новых заболеваний

#### Факторы, связанные с патогеном

Накопление мутаций в геноме  
Горизонтальный перенос генов  
Мультипатогенные инфекции  
Изменение антигенных детерминант

#### Факторы, связанные с организмом хозяина

Восприимчивость к инфекциям  
Наличие путей международных сообщений  
Увеличение плотности популяции  
Некоторые религиозные и национальные традиции  
Биотерроризм

#### Факторы, связанные с окружающей средой

Изменения экологической обстановки  
Развитие промышленности  
Климатические изменения  
Ошибки системы здравоохранения  
Эпидемии у животных  
Войны и голод

Большинство эпидемий возникает из-за внешних, климатологических или географических, факторов. Однако иногда их причиной становится антропогенное воздействие. К примеру, некоторые из зоонозов переходят к человеку, потому что исчезают места обитания их природных резервуаров — животных-хозяев. Вырубка лесов в горных районах может привести к наводнениям и затоплению населенных пунктов, что косвенно приводит к вспышкам холеры и других инфекционных заболеваний. Отдельной категорией таких «антропогенных» эпидемий являются целенаправленные манипуляции с патогенами, к примеру, утечка из лабораторий модифицированных биологических агентов, которые либо сами по себе, либо в результате горизонтального переноса генов вирулентности от других биологических объектов могут становиться серьезной биологической угрозой. Механизмы появления новых патогенов приведены на рис. 1.

К сожалению, на сегодняшний день отсутствуют четкие алгоритмы и готовые коммерческие приложения для идентификации новых патогенных организмов, поэтому в случае их возникновения задачи идентификации и определения характеристик патогена приходится решать с помощью индивидуальных лабораторных подходов. В обзоре подробно рассматриваются случаи возникновения новых инфицирующих агентов в XXI веке, а также обсуждается возможность разработки унифицированного подхода к выявлению патогенов с использованием новых технологий секвенирования.

#### Примеры и механизмы появления новых патогенов в XXI веке

##### Новые коронавирусы

В XXI веке человечество уже столкнулось с появлением как минимум 9 новых патогенов (рис. 2). Так, одним из глобальных вызовов мировой системе здравоохранения

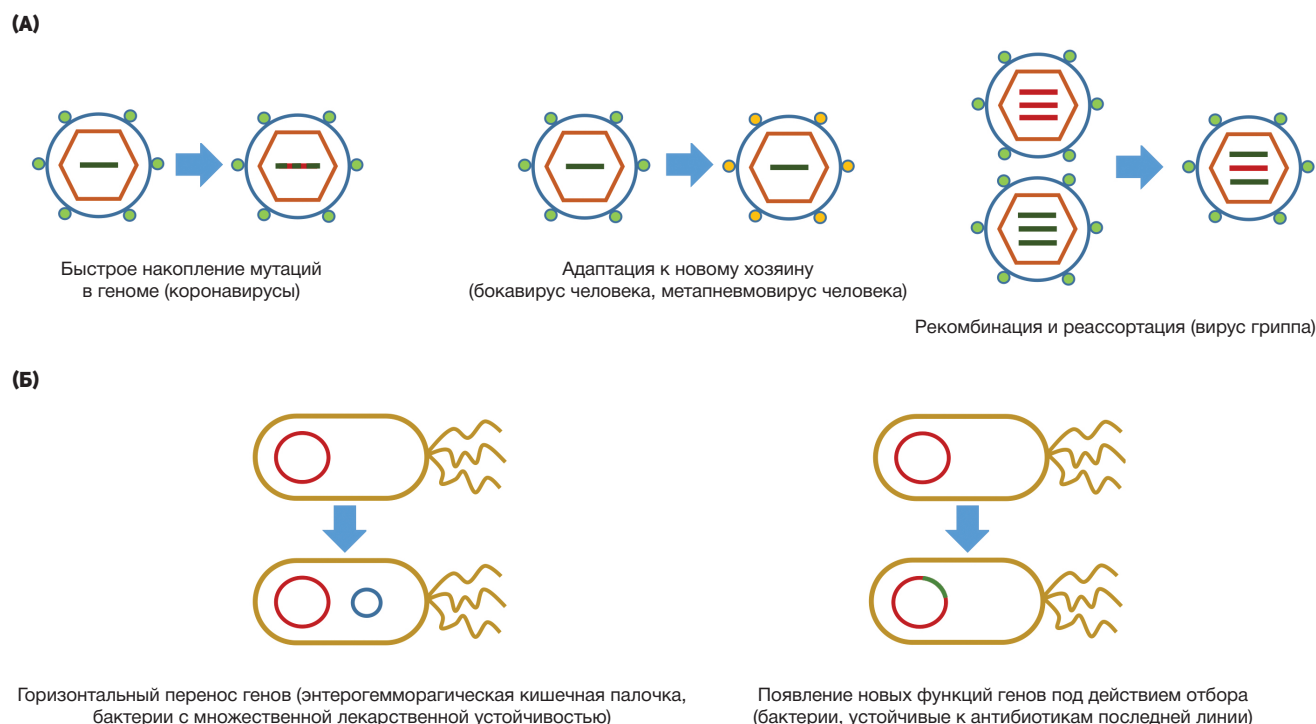


Рис. 1. Генетические механизмы появления новых патогенов среди вирусов (А) и бактерий (Б)

стало появление в 2002 г. в Китае нового, неизвестного ранее возбудителя атипичной пневмонии. В ноябре 2002 г. в г. Фошан провинции Гуандун скончался фермер, и, хотя диагноз не был точно установлен, стало ясно, что он пал жертвой нового опасного заболевания. Первым этапом признания начала эпидемии стало 27 ноября 2002 г., когда канадская Глобальная разведывательная сеть по здравоохранению (Global Public Health Intelligence Network), являющаяся частью Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), выпустила оповещение о начале серьезной эпидемии в Китае. Затем ВОЗ, после того как получила результаты расследования о вспышке заболевания, запросила информацию у китайских властей. Но об эпидемии стало по-настоящему широко известно только после выхода заболевания за пределы Китая: в феврале 2003 г. в госпитале Ханоя скоропостижно скончался американский бизнесмен, заразившийся пневмонией в Китае. Скорость, с которой новое заболевание вызвало его смерть, поразила общественность. К 15 марта заболевание было названо тяжелым острым респираторным синдромом (ТОРС) [1–3], а к 27 марта возбудитель был идентифицирован как совершенно новый коронавирус и был назван коронавирусом ТОРС [4–6]. С ноября 2002 г. по июль 2003 г. ТОРС перенесли в общей сложности 8 098 пациентов в 25 странах, и 774 случая закончились смертью больных. В определенных популяциях [7] и возрастных группах [8] смертность была очень высокой и могла достигать 40–55 % от числа заболевших. Дальнейшие локальные вспышки заболевания были зарегистрированы в конце 2003 г. и начале 2004 г. в Сингапуре, Тайване, Пекине

и Гуанчжоу в результате случайных лабораторных утечек и передачи вируса от животных к человеку [9]. Эти случаи были напрямую связаны с отменой запрета на разделку пальмовых куниц на рынках и в ресторанах, который был введен на время вспышки атипичной пневмонии [10].

Специфические противовирусные агенты не были доступны во время борьбы со вспышкой ТОРС [11], и основными средствами являлись поддерживающая терапия и антибиотики для противодействия вторичной бактериальной инфекции [12]. При этом эпидемия атипичной пневмонии была локализована в первую очередь благодаря высокоэффективным мерам глобального общественного здравоохранения [13], среди которых были отслеживание контактов и карантин лиц с подозрением на инфекцию и зараженных пациентов [14]. В настоящий момент коронавирус ТОРС больше не циркулирует в человеческой популяции, но обнаружение природных резервуаров коронавирусов, предковых по отношению к коронавирусу ТОРС, (летучие мыши и другие млекопитающие) свидетельствует о потенциальной угрозе повторного возникновения эпидемии [15].

Детекция нового вируса на тот момент была нетривиальной задачей, однако ученые успешно с ней справились. Клинические образцы от пациентов с ТОРС изучали с использованием клеточных культур и молекулярных методов. Вирус был выделен в культуре клеток, затем с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) со случайными (рандомными) праймерами была определена РНК вируса длиной до 300 нуклеотидов. Генетические характеристики вируса показали, что он лишь отдаленно родственен известным

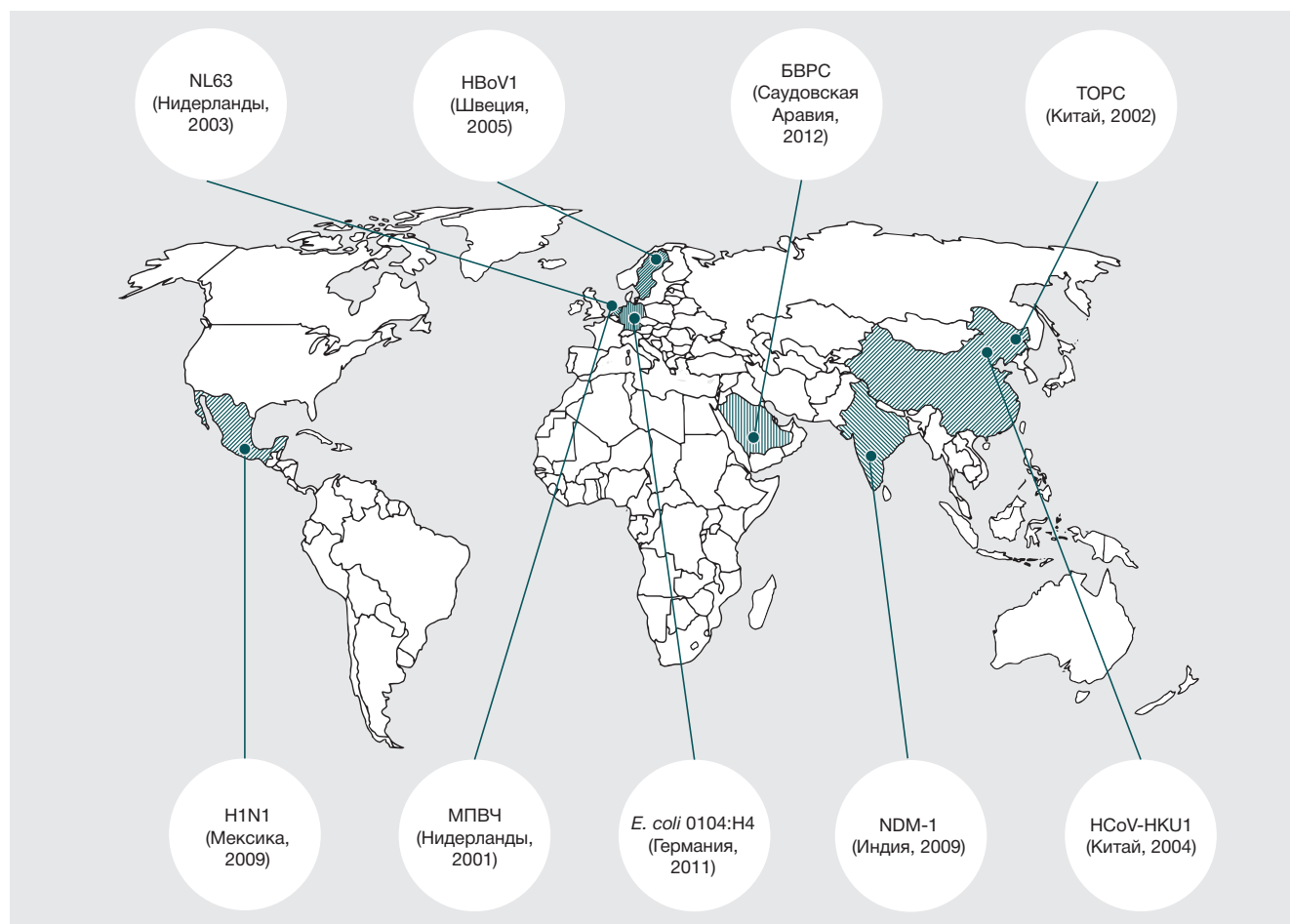


Рис. 2. Карта возникновения новых патогенов в XXI веке

коронавируса (сходство нуклеотидных последовательностей составило от 50 до 60 %). На основании идентифицированных последовательностей были созданы наборы для специфической высокочувствительной детекции нового вируса с помощью ПЦР и ПЦР в «реальном времени» (ПЦР-РВ). Вирус обнаруживался в различных клинических образцах от пациентов с ТОРС, но не в образцах контрольной группы. Высокие концентрации вирусной РНК (до 100 млн молекул на 1 мл) были найдены в мокроте зараженных пациентов. В чрезвычайно низких концентрациях РНК вируса была также обнаружена в плазме крови пациентов с острой фазой заболевания и в кале в конце выздоровления [4]. Несмотря на то, что эпидемия ТОРС была успешно остановлена, этот коронавирус был не единственным представляющим определенную опасность для населения Земли коронавирусом, открытым в XXI веке.

В 2003 г. 7-месячный ребенок, госпитализированный с обструктивным бронхитом и конъюнктивитом, был обследован на присутствие в организме нескольких респираторных вирусов с целью выявления возбудителя, однако все методы диагностики дали отрицательные результаты. Группа исследователей во главе с Лией ван дер Хук использовала модифицированный метод определения вирусов, основанный на анализе полиморфизмов длин фрагментов рестрикции вирусной кДНК (Virus-Discovery-cDNA-AFLP, VIDISCA). Данный метод основан на ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) вирусной РНК с последующим ограниченным расщеплением кДНК с помощью частотных рестриктаз. Результаты показали определенное сходство обнаруженных последовательностей с последовательностями известных коронавирусов, тем не менее различия были достаточными, чтобы указать на открытие нового вида коронавируса, позднее названного коронавирусом человека NL63 [16].

71-летний пациент из Китая попал в больницу с пневмонией в январе 2004 г. Попытки размножить вирус в культуре клеток, ОТ-ПЦР и прямое обнаружение антигена из аспириата носоглотки указали на отсутствие в организме больного известных респираторных вирусов. ОТ-ПЦР на консервативную область гена полимеразы коронавирусов подтвердила наличие коронавируса, однако попытки культивирования возбудителя были безуспешными. Частичное секвенирование генома коронавируса показало высокую гомологичность его последовательности последовательностям других вирусов рода  $\beta$ CoV, включая HCoV-OC43, но она имела иное происхождение. Этот коронавирус человека, названный HCoV-NKU1, через некоторое время удалось выделить из аспириата другой пациентки [17]. Позднее также вирус удалось воспроизвести в культуре клеток реснитчатого эпителия дыхательных путей человека, однако его культивирование по-прежнему остается сложной задачей. С момента открытия HCoV-NKU1 удалось показать, что этот вирус распространен глобально, а ретроспективный анализ хранящихся назофарингеальных препаратов подтвердил его существование по крайней мере с 1995 г. [18].

В июне 2012 г. мир узнал о появлении совершенно нового штамма коронавируса человека. Образец мокроты был отобран у 60-летнего мужчины с тяжелым респираторным заболеванием доктором Сулейманом Факихом в больнице в Джидде (Саудовская Аравия). Анализы на распространенные вирусные респираторные инфекции не позволили выявить биологический агент, вызвавший заболевание. Образец мокроты был отправлен в Роттердам (Нидерланды), где вирус был идентифицирован как новый

коронавирус, условно названный HCoV-EMC (человеческий коронавирус из Erasmus Medical College). Пациент позднее умер вследствие острой пневмонии и последующей почечной недостаточности [19]. С момента открытия этого патогена были определены и описаны в научной литературе несколько новых изолятов, в разных базах данных и СМИ — под разными названиями. Для изучения вируса была организована научная группа из вирусологов, занимающихся коронавирусами. Для того чтобы избежать путаницы в исследованиях для нового вируса было выбрано название «коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (БВРС)», которое было согласовано первооткрывателями вируса, ВОЗ и Министерством здравоохранения Саудовской Аравии [19].

С июня 2012 г. и до 7 февраля 2014 г. были зарегистрированы 182 случая заболевания БВРС, из которых 79 закончились смертельным исходом. По данным ВОЗ на 11 июня 2014 г., вирус вызвал 699 лабораторно подтвержденных случаев болезни, из которых 209 закончились смертью пациентов [20]. Статистика показывает, что в течение 4 месяцев число случаев заболевания увеличилось более чем в 3 раза, т. е. эпидемия далека от своего завершения. Летальность, составляющая до 30 %, значительно выше среди пациентов с сопутствующими заболеваниями: большое число случаев БВРС зарегистрировано у пациентов с иммунодефицитом или другими основными заболеваниями [21, 22]. Кроме того, существует серьезная угроза внутрибольничной передачи инфекции [23].

Клиническая картина заболевания похожа на симптомы ОРВИ и включает ряд патологических состояний дыхательных путей с такими распространенными симптомами, как кашель, лихорадка и желудочно-кишечные нарушения [24], до начала пневмонии [21]. При БВРС также наблюдались острый респираторный синдром (ОРС), почечная недостаточность, перикардит и диссеминированное внутрисосудистое свертывание [24]. Вероятность пандемической вспышки невелика, т. к. вирус, по всей видимости, неспособен к эффективной передаче от человека к человеку [24] и передается только при устойчивом контакте [25], например, в семьях [26], среди медицинских работников [27] и в результате внутрибольничной передачи [28], особенно если у пациента ослаблен иммунитет.

Происхождение этого вируса пока до конца непонятно. Возможно, произошла первичная передача инфекции от верблюда к человеку.

Таким образом, за последнее десятилетие было открыто 4 новых коронавируса, два из которых являются крайне опасными, в то время как два других были обнаружены почти случайно и практически не выделялись на фоне ОРВИ. Эти данные указывают на то, что появление новых высокопатогенных штаммов — событие весьма вероятное, для которого порой достаточно нескольких нуклеотидных замен в составе генома вируса.

#### *Метаневмовирус человека*

В 2001 г. новый вирус был выявлен у 28 пациентов в Нидерландах. Симптомы заболевания, вызванного им, были похожи на симптомы заболевания, вызываемого респираторно-синцитиальным вирусом (РСЧ). Нескольким пациентам потребовалась госпитализация и даже подключение к системе искусственной вентиляции легких. Вирусные изоляты были культивированы в культурах клеток почек человекообразных обезьян (tMK), и цитопатические эффекты, вызванные вирусом, были во многом идентичны



тем, что вызывает РСЧ. Электронная микроскопия супернатанта зараженных клеток выявила парамиксовирусоподобные частицы. Однако результаты ПЦР-PB с праймерами для детекции известных парамиксовирусов были отрицательными. Тогда для получения информации о последовательности неизвестного вируса использовали ОТ-ПЦР с рандомными праймерами. На основании сходства последовательностей и организации генов заключили, что исследуемый вирус является ближайшим родственником птичьего пневмовируса; его идентифицировали как новый вид рода *Metapneumovirus* — метапневмовирус человека (МПВЧ) [29], и он стал первым вирусом этого рода, способным инфицировать людей. Хотя МПВЧ был обнаружен только в 2001 г., филогенетический анализ показал, что вирус циркулировал в человеческой популяции в течение примерно 50 лет [30, 31]. От 7 до 19 % всех случаев респираторных инфекций у детей (и госпитализированных, и получавших помощь амбулаторно) были обусловлены МПВЧ [32–34]. Как сообщается, этот вирус является вторым по частоте обнаружения среди вирусов, вызывающих инфекции дыхательных путей [35].

#### Бокавирус человека

Первый бокавирус человека (hBoV) был обнаружен в 2005 г. в назофарингеальном аспирате 282 пациентов с неидентифицированной инфекцией нижних дыхательных путей в Швеции. Исследователи использовали новый метод, который включал этапы обработки образцов ДНКазой, чтобы исключить их загрязнение невирусными нуклеиновыми кислотами, с последующей ОТ-ПЦР с неспецифическими праймерами. Анализ полученных последовательностей с помощью методов биоинформатики выявил присутствие в образцах нового парвовируса, высокомолекулярного парвовирусам быков и собак (отсюда название рода — *Bocavirus*). Новый вирус был назван hBoV1 [36]. Три других штамма hBoV были обнаружены в 2010 г. и названы hBoV2, hBoV3 и hBoV4 [37–39].

hBoV1 — это возбудитель респираторных заболеваний, присутствующий во всех регионах планеты и связанный с примерно 19 % всех вирусных инфекций верхних и нижних дыхательных путей [40–42]. hBoV1 эффективно инфицирует культуру эпителиальных клеток дыхательных путей человека и приводит к их цитолизу [43–45]. Эти данные подтверждаются клиническими наблюдениями, указывающими на то, что инфекция действительно проходит в форме респираторного заболевания. Напротив, hBoV2–hBoV4 локализуются в желудочно-кишечном тракте, при этом hBoV2 и, возможно, hBoV3, связаны с гастроэнтеритами [46, 47]. Интересно, что hBoV2 — единственный кишечный бокавирус, изолированный из назофарингеального аспирата, и, следовательно, может также быть связан с респираторными заболеваниями [48, 49]. hBoV1 обнаруживается во всех возрастных группах, но преимущественно среди детей в возрасте от 6–24 мес. [50, 51] и редко — среди взрослых [52–56]. Передача вируса и заражение им происходят в течение всего года, но чаще в зимние и весенние месяцы [55, 57–59].

#### Вирус гриппа

Другим механизмом появления новых патогенных вирусов является рекомбинация их геномов. Характерным примером служит вирус гриппа (ВГ) человека с сегментированным РНК-геномом, который характеризуется высокой

изменчивостью. При заражении несколькими различными штаммами ВГ возможна реассортация геномных РНК этих штаммов и образование новых вариантов ВГ с новыми патогенными свойствами. Постоянные изменения в составе двух поверхностных антигенов (гемагглютинина и нейраминидазы) определяют эпидемиологию вируса гриппа.

Водные птицы являются естественными резервуарами ВГ, в которых, похоже, вирус достиг текущего эволюционного статуса в ходе ряда адаптаций. Отряды гусеобразных и ржанкообразных являются исходными хозяевами ВГ с самым высоким разнообразием штаммов: 17 подтипов по гемагглютину и 9 подтипов по нейраминидазе [60]. Передача вируса наземным птицам или млекопитающим привела к его быстрой эволюции [61]. Некоторые варианты ВГ циркулируют в человеческих популяциях (H1N1, H3N2), среди свиней (H1N1, H1N2), лошадей (H3N8, H7N7) и собак (H3N8) [62]. Свиньи стали одним из главных резервуаров для возникновения пандемических штаммов ВГ вследствие того, что они имеют рецепторы как для ВГ птиц, так и для ВГ человека (2,3-сиаловые кислоты и 2,6-сиаловые кислоты соответственно) [63, 64]. Свиньи — эффективные «смесительные емкости» для вируса, источник новых реассортантных вариантов, которые обладают смешанными (рекомбинантными) геномами и способны вызвать очередную пандемию [61].

Пандемия — самое страшное проявление вируса гриппа, когда заражены одновременно 20–40 % человеческой популяции по всему миру. Одна из первых документально зафиксированных пандемий вируса гриппа произошла в 1918 г., когда от смертельной «испанки» (штамм H1N1) погибли 25 млн человек [60]. За ней последовали «азиатский грипп» (штамм H2N2) в феврале 1957 г., «гонгконгский грипп» (штамм H3N2) в 1968 г., «русский грипп» (штамм H1N1) в 1977 г. и «свиной грипп» (штамм H1N1) в 2009 г. Последний стал первой и пока единственной пандемией XXI века. Штамм H1N1 являлся реассортантом между евразийским вирусом свиного гриппа и североамериканским тройным реассортантом H1N2 [65, 66]. По сравнению со своим зловещим предком он относительно менее вирулентен, но все-таки стал причиной смерти более 200 и 83 тыс. человек соответственно [67].

С момента идентификации нового штамма вируса птичьего гриппа H7N9 30 марта 2013 г. китайскими властями были зарегистрированы 135 лабораторно подтвержденных случаев инфекции и 45 смертей, данные о которых поступили из Шанхая, Аньхоя, Цзянсу и Чжэцзяня [68]. Единственный случай заболевания за пределами Китая был зафиксирован в Тайване, но и тогда первичное заражение произошло в Китае [69]. Это первые случаи инфицирования людей вариантом H7N9 вируса птичьего гриппа [70, 71]. Ранее нелетальные вирусные инфекции, вызванные штаммами вируса гриппа подгруппы H7 (H7N2, H7N3, H7N5), наблюдались по всей Европе и в США [72]. Исключением стала единственная смерть от штамма H7N7 в Нидерландах в 2003 г. [73, 74]. Интересно, что указанные инфекционные вспышки совпадали со вспышками гриппа у домашней птицы, но для варианта H7N9 такая закономерность отмечена не была. Случаи заражения H7N9 не выглядят эпидемиологически связанными, но возможность передачи инфекции от человека к человеку, по всей видимости, все же существует [75]. Задержки в развитии серологических реакций у лиц, инфицированных штаммом H7N9, осложняют серологическую детекцию вируса [76]. Кроме того, у домашней птицы отмечено латентное

течение заболевания (в отличие от инфекции, вызываемой штаммом H5N1), что существенно затрудняет определение источника и способа передачи патогена и, следовательно, увеличивает риск пандемии.

#### *Кишечная палочка, продуцирующая шига-токсин*

Еще одним вариантом возникновения новых патогенных организмов является приобретение хорошо известными организмами новых свойств, таких как продукция токсинов или устойчивость к антибиотикам. Примером результата такой генетической перестройки является эпидемия, которая была вызвана штаммом O104:H4 энтерогемморагической кишечной палочки в 2011 г. в Германии. Это была самая серьезная вспышка инфекции из когда-либо зарегистрированных, вызванных кишечной палочкой, продуцирующей шига-токсин (шига-токсин продуцирующая кишечная палочка, ШПКП): в общей сложности были зафиксированы 3 842 случая инфекции, в том числе 2 987 случаев лабораторно подтвержденного гастроэнтерита (из них — 18 смертей) и 855 случаев гемолитико-уремического синдрома (35 смертей) [77]. Вспышка началась 8 мая, достигла своего пика 22 мая и 4 июля полностью закончилась. Возможно, эпидемию удалось остановить путем предупреждения людей о потреблении ими загрязненных продуктов питания, но также возможно, что зараженные продукты просто перестали поступать на рынки. Были публично раскритикованы запоздалые и вначале ложные заявления о связи инфекции с огурцами и капустой, которые на деле не имели к ней отношения [77]. 10 июня в качестве источника инфекции немецкими властями были объявлены проростки пажитника, импортировавшиеся из Египта [78].

Эпидемиологический анализ инфекции, изначально передающейся через пищу, становится сложнее производить, когда патоген начинает передаваться от человека к человеку. Такой способ инфицирования был отмечен примерно в 20 % домохозяйств с первичным пациентом, инфицированным через пищу хорошо охарактеризованным родственным штаммом энтерогемморагической кишечной палочки O157:H7 [79]. Вторичная передача в быту у взрослых пациентов также была выявлена и для штамма O104:H4 во Франции [80] и Нидерландах [81] за счет наблюдавшейся задержки начала инфекции по сравнению со стандартным временем инкубации (от 7 до 9 дней для O104:H4). Вторичные трансмиссии также были отмечены в Гессене (Германия), который находился за пределами главного очага эпидемии на севере страны [82]. Исследования также документально подтвердили передачу инфекции не только в семьях, но и в больницах и даже в микробиологической лаборатории.

Секвенирование генома штамма O104:H4, обнаруженного в Германии, было выполнено в кратчайшие сроки сразу несколькими группами исследователей. Первая последовательность была получена в Пекинском институте геномики, где изучали образец, переданный исследователями из Университета Гамбурга. Китайские ученые выполнили секвенирование генома бактерии за 3 дня, используя платформу Ion Torrent. Первая аннотированная последовательность генома была опубликована группой из Геттингенского университета. При этом были использованы геномные секвенаторы Flex [83], Ion Torrent [84] и PacBio RS [85]. Важно, что в результате использования комбинированного подхода с применением нескольких технологий высокопроизводительного секвенирова-

ния было достигнуто высокое качество сборки (по длине прочтения, по числу ошибок в последовательностях, по числу пропусков и пр.). Картирование последовательностей продемонстрировало сходство полученного штамма с четырьмя другими штаммами энтерогемморагической кишечной палочки, вызвавшими вспышки инфекций, в том числе штаммом энтероагрегативной кишечной палочки (ЭАКП), выделенной в конце 1990-х гг. у проживавших в Центральной Африке пациентов с ВИЧ-инфекцией, которые страдали от постоянной диареи [86]. Однако африканский штамм не содержал профага Stx2 [84]. Mellmann и соавт. предложили схему эволюции штамма O104:H4, согласно которой предковый штамм преобразовался в O104:H4 вследствие удаления и приобретения мобильных ДНК-элементов путем горизонтального переноса [83]: немецкий вариант патогена получил плазмиды, несущие гены одного из типов фимбрий/пилей (AAF/I), и потерял плазмиды, несущие гены фимбрий AAF/III и термостойкого энтеротоксина Аста, а, кроме того, приобрел плазмиду, несущую гены ферментов TEM-1 и CTX-M-15, определяющих устойчивость к антибиотикам. Сравнение эпидемических штаммов между собой также показало наличие крупномасштабных делеций, вставок и инверсий между изолятами, подтвердив, таким образом, существенную геномную мобильность. Исследователи также установили, что именно эти структурно различающиеся регионы содержат участки, кодирующие факторы вирулентности.

Почему штамм O104:H4 отличался крайне высокой вирулентностью? По результатам изучения генома и генов вирулентности оказалось, что у этого штамма необычное сочетание генов вирулентности из штаммов ШПКП (профаг Stx2, длинные полярные фимбрии, устойчивость к телуридам, система потребления железа) и штаммов ЭАКП (AAF/I, регулятор транскрипции AggR, дисперсин Aap и энтеротоксин шигеллы Set1) [87]. Последние из описанных локализуются в основном на вирулентной плазмиде pAA [83]. Таким образом, в геноме O104:H4 два различных мобильных элемента, профаг Stx2 и плаزمида pAA, обеспечивают вирулентность возбудителя, что достаточно необычно. Возможно, именно такое сочетание факторов вирулентности штаммов ШПКП и ЭАКП привело к появлению этого необыкновенно опасного патогена: он вызывает цитотоксическое повреждение эпителия кишечника, облегчающее системную адсорбцию шига-токсина, что, в свою очередь, может объяснить высокую распространенность случаев гемолитико-уремического синдрома в ходе эпидемии в Германии. Несмотря на наличие в геноме штамма O104:H4 двух генов устойчивости к антибиотикам, эпидемиологическая ситуация, в частности, количество летальных исходов, была менее печальной, чем могла бы быть, если бы вирус обладал мультирезистентностью к более широкому ряду антибиотиков.

#### *Антибиотикорезистентность и супербактерии*

Штаммы с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) становятся все более распространенными причинами внутрибольничных инфекций, начиная с первых случаев в 1980-х гг. [88]. Многие страны, в том числе и Россия, столкнулись с растущим числом инфекций, устойчивых к лечению традиционными антибиотиками. Следует отметить, что основными очагами развития и распространения инфекций, вызываемых такими патогенами, как метициллин-устойчивый золотистый стафилококк, ванкомицин-

устойчивый энтерококк и многие грамотрицательные бактерии с МЛУ, стали палаты интенсивной терапии [89].

Грамотрицательные бактерии, устойчивые к карбапенемам, являются одной из самых больших проблем. Карбапенемы — предпочтительные препараты (препараты выбора, *drug of choice*) при лечении многих инфекций, вызываемых грамотрицательными бактериями [90]. Тем не менее широкое использование карбапенемов способствовало развитию устойчивости к ним среди этих патогенов. Наиболее часто встречающимися микроорганизмами, устойчивыми к карбапенемам, являются синегнойная палочка *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* и энтеробактерии [91].

Синегнойная палочка вызывает тяжелые инвазивные заболевания у пациентов с ослабленным иммунитетом или находящихся в критическом состоянии. Изоляты *P. aeruginosa*, полученные от больных отделений интенсивной терапии, показывали устойчивость к карбапенемам примерно в 28–37 % случаев [92, 93]. *A. baumannii* также является одним из основных возбудителей внутрибольничных инфекций. Изначально этот патоген был восприимчив к имипенему в большинстве медучреждений. Затем его карбапенем-устойчивые штаммы показали быстрый рост во всем мире, и в некоторых отделениях интенсивной терапии в 50–60 % случаев внутрибольничные инфекции, вызванные ими, не поддаются лечению имипенемом [94, 95]. Многие энтеробактерии, широкий спектр бета-лактамаз-продуцирующих кишечных палочек и штаммы *Klebsiella pneumoniae*, устойчивые к карбапенемам, также являются проблемой в отделениях интенсивной терапии, поскольку карбапенемы считаются последним средством для лечения вызываемых ими инфекций [96].

Считается, что основной движущей силой выработки карбапенемовой устойчивости было интенсивное использование цефалоспоринов третьего поколения, азтреонама и имипенема. Появление в XXI веке полностью устойчивых к антибиотикам бактериальных штаммов, так называемых «супербактерий», — это серьезный вызов современной медицине. Новые опасные патогены могут возникать не только за счет приобретения генов устойчивости, но и за счет активации ряда «скрытых» генов устойчивости вследствие всего нескольких значимых нуклеотидных замен в них. Подобные генно-инженерные модификации — обычное явление для микроорганизмов. В этом контексте приобретает значимость изучение бактериального резистенс-ма — совокупности всех генов устойчивости микробиологического сообщества — для эффективного выявления и борьбы с патогенами.

Концепция резистенс-ма антибиотиков основана на понимании того, что почвенные актинобактерии и многие другие микроорганизмы являются высокопродуктивными производителями антимикробных соединений. Очевидно, что для сохранения жизнеспособности у микроорганизма должны возникать/развиваться не только механизмы защиты от антибиотиков, но и способность продуцировать антибиотики. В результате многие компоненты резистенс-ма развились задолго до того, как применение антибиотиков стало клинически значимым и распространенным [97]. Ряд исследований подтвердил это. Метагеномный анализ образцов древней ДНК, собранных из зоны вечной мерзлоты, продемонстрировал присутствие генов устойчивости к бета-лактамам, тетрациклиновым и гликопептидным антибиотикам [98]. Важным открытием явилось то, что, как оказалось, древние гены устойчивости к гликопептидам (*vanHAX*) филогенетически кластеризуются с современными

последовательностями из гликопептид-продуцирующих организмов, а биохимический анализ одного из важнейших продуктов генов устойчивости к гликопептидам — VanA — показал, что его функции и 3D-структура существенно не изменились в течение тысячелетий [99]. В другом исследовании бактерии, собранные в пещерах, изолированных от поверхности в течение более четырех миллионов лет, оказались фенотипически устойчивыми к 14 различным антибиотикам [100]. Генотипирование и биохимические исследования показали, что гены устойчивости присутствуют в микробном пангеноме независимо от селективного давления со стороны человека [100].

Несмотря на то, что самостоятельное и древнее происхождение резистенс-ма стало очевидным, современное и довольно мощное селективное давление на его формирование и трансформацию в результате деятельности человека хорошо известно. Протогены устойчивости не формируют устойчивый фенотип, но имеют потенциал превращения в полноценные гены устойчивости в результате мутации и/или изменений в контексте. Мутации фермента, приводящие к переходу его из одного функционального класса в другой, представляются маловероятными, а вот изменение, в том числе расширение спектра субстратной специфичности ферментов при сохранении функции кажется более вероятным. Структурные исследования продемонстрировали эволюционную близость между линкозамидазами и аминогликозиднуклеотидилтрансферазами и полимеразными, и это позволяет предположить, что предковые полимеразы являлись протогенами устойчивости, которые в процессе эволюции развились в эти антибиотико-модифицирующие гены [101].

По аналогии выявленные консервативные структурные элементы и биохимические механизмы позволяют предположить, что протеинкиназы и белковые ацетилтрансферазы имеют общих предков с протогенами устойчивости, из которых сформировались гены устойчивости к аминогликозидам [102, 103]. Более того, даже сами гены устойчивости могут быть протогенами устойчивости для других лекарственных препаратов. К примеру, аминогликозид-ацетилтрансфераза *acc(60)-la-cr* обеспечивает также устойчивость к хинолонам [102]. Предковый фермент *acc(60)-la* обеспечивает устойчивость к аминогликозиду канамицину, а мутаций двух аминокислотных остатков в его составе — Trp102Arg и Asp179Tyr — оказалось достаточно для распространения его субстратной специфичности на некоторые хинолоновые антибиотики, например ципрофлоксацин, причем без потери аминогликозид-ацетилтрансферазной активности.

Частота встречаемости протогенов устойчивости в резистенс-ма неизвестна, и для приобретения ими клинической значимости требуются значительные эволюционные события. Однако приведенные выше примеры подчеркивают потенциал ферментов для расширения своего «портфолио» потенциальных субстратов и их возможную значимую роль в возникновении новых генов устойчивости.

Подобно протогенам устойчивости «молчащие» гены устойчивости не способны формировать резистентный фенотип в их текущем структурном состоянии. В отличие от протогенов эти гены могут быть детектированы в резистенс-ма на основании гомологии между их последовательностями и последовательностями известных генов устойчивости. Например, два фенотипически чувствительных к антибиотикам штамма *Citrobacter freundii*, изолированные в эпоху до использования антибиотиков, содержат гены *AmpC* бета-лактамазы [103]. Мутации, приводящие



к экспрессии AmpC в данных штаммах, сопровождаются клинической устойчивостью к цефалоспорином расширенного спектра действия. *Salmonella enterica* дикого типа, культивируемая на богатой питательной среде, чувствительна к аминогликозидам стрептомицину и спектиномицину. Однако тот же штамм устойчив при выращивании на минимальной среде при активации гена *aadA* аминогликозид-аденилтрансферазы [104]. Когда *aadA* был суперэкспрессирован в индуцибельной плазмиде, минимальная ингибирующая концентрация стрептомицина также существенно увеличилась дозо-зависимым способом. Таким образом, общий уровень экспрессии гена устойчивости, вероятно, имеет решающее значение в процессе формирования устойчивого фенотипа.

Если мутация — это «рабочая лошадка» эволюции, то горизонтальный перенос генов — это «волшебная палочка», способная мгновенно преобразовать неактивный ген устойчивости в функциональный за счет увеличения числа копий гена или же изменения контекста, обеспечивающего экспрессию гена под «сильным» промотором. Однажды попав в состав мобильного элемента, гены устойчивости получают возможность фактически неограниченно распространяться по микробному пангеному, где они могут накапливать дальнейшие мутации, улучшающие функцию и расширяющие спектр возможных субстратов кодируемых ими ферментов, в ответ на селективное давление со стороны окружающей среды.

Чтобы оценить вклад генов, способных к горизонтальному переносу в составе генома патогенов человека, достаточно взглянуть на золотистый стафилококк: на мобильные элементы приходится 15–20 % его генома, они включают бактериофаги, островки патогенности, плазмиды, транспозоны и стафилококковые кассетные хромосомы [105]. Эти мобильные элементы накопились в геноме возбудителя под селективным давлением, но их источник — бактерии, которые некогда сосуществовали с золотистым стафилококком. В то время как детали сетевых взаимодействий между патогенными микроорганизмами и комменсалами остаются в значительной степени неясными, становится все более очевидным, что основные резервуары генов резистентности, доступные патогенам, находятся в человеческом микробиоме [106]. Например, функциональные метагеномные библиотеки, полученные из объединенных проб микробиомов кишечника от младенцев, детей и подростков, содержали данные о генах устойчивости к 14 антибиотикам [107]. Более того, все библиотеки содержали данные о генах устойчивости к тетрациклину, триметоприму, триметоприм-сульфаметоксазолу, D-циклосерину, хлорамфениколу и пенициллину, а многие — к аминогликозидам, глицилциклинам и бета-лактамам. Примерно 3 % от общего числа генов резистентности к антибиотикам в данных библиотеках оказались ассоциированы с мобильными элементами, такими как транспозоны или интегроны [108]. Последствия применения антибиотиков для кишечной микрофлоры активно изучаются. К примеру, удалось показать, что использование антибиотиков, особенно метронидазола и бета-лактамов, снижает общее микробное разнообразие в желудочно-кишечном тракте [108]. Подобные события, когда один бактериальный таксон становится преобладающим в микрофлоре кишечника, зачастую связаны с повышенным риском последующей бактериемии [109].

По всей видимости, один из путей получения генов устойчивости кишечной микрофлорой — это горизонтальный перенос генов устойчивости от сельскохозяйствен-

ных животных к человеку через микрофлору пищи. Авторы одной из работ обнаружили, что 42 уникальных гена устойчивости были перенесены сельскохозяйственными изолятами микрофлоры в человеческий микробиом, что позволяет предположить, что микрофлора сельскохозяйственных животных, стоки и отходы ферм могут способствовать развитию клинической резистентности патогенов человека [109]. Мобильные элементы, несущие гены устойчивости к антибиотикам, широко распространены в потребляемой нами вместе с продуктами питания микробиоте [109–113] и являются одним из потенциальных источников генов устойчивости для человеческого микробиома. Это связано со слабым контролем за использованием антибиотиков в сельском хозяйстве. Мониторинг на китайских свинофермах [114] показал, что гены устойчивости были весьма распространены в почвах вследствие использования в качестве удобрения навоза от свиней, получавших корм, содержащий антибиотики. В 3 раза больше уникальных генов устойчивости обнаруживали в геномах патогенов в сельскохозяйственных пробах по сравнению с контрольными, в том числе к антибиотикам, важным для медицины: макролидам (*mphA* и *erm*), цефалоспорином (*bla*-TEM и *bla*CTX-M), аминогликозидам (*aph* и *aad*) и тетрациклину (*tet*). Количество транспозаз в геномах патогенов из образцов навоза свиней было в 90 000 раз больше по сравнению с контролем, из образцов почвы — в 1 000 раз больше. Численность транспозаз коррелирует с распространением генов устойчивости в микробиоте сельскохозяйственной продукции, в особенности генов устойчивости к тетрациклину.

Таким образом, все механизмы возникновения новых патогенов можно классифицировать отнесением к одной из двух больших групп случаев:

1. перенос ранее существовавшего патогена от одного хозяина к другому, сопровождающийся тяжелым течением заболевания вследствие неадаптированности организма нового хозяина к новому патогену (один из самых распространенных примеров — цитокиновый шторм);

2. появление новых патогенных свойств у уже известного биологического агента, обычно получаемых в ходе горизонтального переноса генов.

### Проблемы идентификации новых патогенов существующими аналитическими методами

Для обнаружения и идентификации патогенов был разработан ряд технологий и коммерческих приложений, позволяющих выявлять нуклеиновые кислоты и антигены, входящие в состав патогенов. И хотя утверждается, что многие из них удовлетворяют высоким требованиям по таким параметрам, как минимальная пробоподготовка, скорость анализа, точность и надежность, в реальности лишь немногие из них могут быть широко использованы на практике, в особенности в полевых условиях [115]. Диагностические методы, применяемые для детекции биоугроз, должны обеспечивать своевременное обнаружение и подтверждение биологических факторов риска непосредственно в образце с минимальным уровнем ложноположительных и ложноотрицательных результатов, а также выявлять модифицированные и неизвестные патогены. Устройства для обнаружения биоугроз должны быть портативными, легкими в использовании и способными обнаруживать несколько факторов, а порой — десятки и сотни факторов одновременно [115].



В настоящее время существует несколько методов диагностики, удовлетворяющих большинству из заданных критериев, однако ни один не удовлетворяет всем из них. В отличие от химических детекторов, способных обнаруживать химические вещества в количествах, угрожающих человеческому здоровью, биологические детекторы редко могут обнаруживать микроорганизмы непосредственно в образцах на уровне или ниже уровня риска из-за их низкой чувствительности и необходимости проведения трудоемкой подготовки пробы для анализа. Диагностические системы, основанные на амплификации нуклеиновых кислот, в целом значительно чувствительнее, чем системы, базирующиеся на использовании антител [115]. Так, метод ПЦР позволяет обнаружить в образце одиночные молекулы нуклеиновых кислот микроорганизма за достаточно короткое время [116–118]. Однако этот метод требует тщательной подготовки пробы и не позволяет напрямую обнаруживать токсины и инфекционные агенты, не содержащие нуклеиновых кислот, к примеру прионы [115].

Помимо чувствительности, не менее важной характеристикой диагностических методов является специфичность, поскольку необходимо свести к минимуму фоновые сигналы и устранить ложноположительные результаты в образцах, которые зачастую представляют собой сложную смесь органических и неорганических соединений. При этом «неспецифика» может также возникать в случае наличия в пробах высоких концентраций конкурирующих антигенов или фрагментов ДНК. В случае с методами, основанными на ПЦР, высокая чувствительность может быть их слабым местом вследствие возможной контаминации образца и получения ложноположительного результата из-за ингибирования работы полимеразы различными веществами, включая гуминовые кислоты и гем.

Другим важным требованием к диагностическим методам является их воспроизводимость. На этот параметр может влиять целый ряд факторов, в том числе такие, как стабильность реагентов и различия в условиях анализа. Значение этих факторов может быть уменьшено путем стандартизации условий сбора образцов и их последующего анализа.

Помимо всего вышеперечисленного, диагностические методы должны обеспечивать обнаружение в образцах различных биологических агентов, т. е. предоставлять возможность мультиплексного анализа. Это необходимо потому, что в исследуемых образцах могут одновременно содержаться токсины, бактерии, вирусы и пр. Более того, в некоторых случаях в образцах необходимо определить неизвестные факторы, которые могут быть преднамеренно изменены в результате генетической или антигенной модификации или же представлять собой новые или неизвестные варианты известных микроорганизмов, что делает их обнаружение чрезвычайно трудной задачей. Стоит отметить, что и обычные биологические агенты трудно обнаружить в зараженных образцах. Образцы биоматериала человека (например, кровь и фекалии), а также образцы пищи, воды и даже воздуха могут создавать существенные проблемы для диагностики. К примеру, антикоагулянты, ДНК лейкоцитов и компоненты гема ингибируют ПЦР [115, 119, 120], что приводит к появлению ложноотрицательного результата. Жиры в пищевых продуктах и большое количество сопутствующих бактерий в образцах фекалий могут искажать результаты иммунологических анализов. По этой причине биологические агенты должны быть выделены или очищены из собранных образцов до анализа и идентификации, что увеличивает время

анализа и, главное, делает невозможным полевое применение этих технологий.

Важным фактором для биодетекции является тип материала, влияющий на порядок хранения и транспортировки проб. Образцы, полученные из воды и воздуха, должны быть сконцентрированы для предварительного обнаружения целевых молекул. Пробы воздуха должны быть переведены в жидкое состояние, поскольку большинство методов диагностики приспособлены для анализа только жидких образцов. Объем образца, а также время и метод его транспортировки также важны, особенно в случае с живыми организмами. Иногда для оценки возможного риска может потребоваться подтверждение жизнеспособности микроба, и тогда, к примеру, обычные генетические или иммунологические методы анализа будут неинформативными.

Различные методы обнаружения и идентификации неизвестных патогенных организмов активно разрабатываются в течение многих лет, вкладываются значительные финансовые средства компаний-разработчиков [115]. Одно из перспективных направлений — технологии высокопроизводительного секвенирования.

### **Высокопроизводительное секвенирование: основные принципы**

Высокопроизводительное секвенирование (next generation sequencing, NGS) представляет собой группу методов секвенирования, позволяющих в отличие от классического секвенирования по Сэнгеру получать за один запуск прибора большие объемы прочитанной первичной последовательности ДНК за счет параллельного секвенирования большого количества различных фрагментов. Подобная особенность сделала высокопроизводительное секвенирование по-настоящему универсальным методом генетической характеристики живых объектов. В настоящий момент приложения, основанные на методах NGS, активно применяются не только в сфере научных исследований в таких областях, как молекулярная систематика, биоинженерия, клеточная и молекулярная биология, но и в практической деятельности человека: медицинской клинической генетике, криминалистике, селекции и др.

Все модификации NGS можно поделить на две большие группы: первый тип методов основан на секвенировании заранее амплифицированных фрагментов ДНК из пробы, второй тип связан с прочтением первичной последовательности единичных молекул.

Общий принцип методов секвенирования, основанных на предварительной амплификации матриц, приблизительно одинаков независимо от реагентно-аппаратной базы. Он включает стадию получения библиотек, заключающуюся в получении небольших фрагментов ДНК и введении в их состав адаптерных нуклеотидных последовательностей для закрепления на носителе и отжига специфических праймеров для секвенирования; стадию иммобилизации полученных фрагментных библиотек на микросферах или поверхности проточной ячейки с последующей амплификацией с помощью эмульсионной или мостиковой ПЦР соответственно; стадию гибридизации специфических праймеров с адаптерными участками и непосредственно секвенирования. При этом подходе прочтение последовательности всегда связано с достройкой комплементарной цепи, причем достройка может осуществляться либо путем синтеза новой цепи, либо путем лигирования. Достройка цепи сопровождается испусканием сигнала, природа

которого зависит от типа платформы для секвенирования. Сигнал регистрируется прибором, который переводит его в последовательность нуклеотидов.

Пиросеквенирование, или 454-секвенирование, появившееся первым из всех методов NGS, использует для детекции световой сигнал, возникающий при достройке комплементарной цепи ДНК [121–123], в то время как полупроводниковое секвенирование основано на фиксации изменения pH, происходящего вследствие отщепления протона при образовании фосфодиэфирных связей при достройке цепи [124–127]. Третий вариант — это секвенирование путем лигирования, при котором детектируется флуоресцентный сигнал, возникающий в процессе достройки комплементарной цепи в ячейке, через которую пропускают смесь, содержащая лигазу и специальные флуоресцентно меченные нуклеотидные зонды (октамеры) [128]. Наконец, наиболее распространенным вариантом является секвенирование путем синтеза с использованием обратимо терминированных флуоресцентных нуклеозидтрифосфатов. Амплификация проводится внутри проточной пористой ячейки, через которую пропускаются реагенты для синтеза ДНК [129]. В результате амплификации с использованием мостиковой ПЦР внутри каналов ячейки генерируются кластеры копий исходных фрагментов библиотеки, каждый из которых соответствует одному прочтению. Высокая плотность кластеров (до 800–900 тыс. на мм<sup>2</sup>) обеспечивает максимально большой объем получаемых данных. Затем полученные кластеры молекул ДНК секвенируются по принципу, сходному с секвенированием по методу Сэнгера [130, 131].

К недостаткам методов высокопроизводительного секвенирования, основанных на предварительной амплификации ДНК-фрагментов, можно отнести: ошибки в гомополимерных участках и местах, где имеются однонуклеотидные полиморфизмы; сложности разрешения в повторах; зависимость точности прочтения от GC-состава фрагментов ДНК и т. д. [132–134]. Поэтому в настоящее время разрабатывают альтернативные методы секвенирования, в частности, мономолекулярное секвенирование.

Одна из технологий мономолекулярного секвенирования основана на пропускании секвенируемого участка ДНК через активный центр ДНК-полимеразы, при этом высокочувствительной CCD-камерой фиксируется сигнал от присоединения флуоресцентно меченного нуклеотида, попадающего в активный центр ДНК-полимеразы в процессе достройки комплементарной цепи. При присоединении нуклеотида флуоресцентная метка отщепляется, и сигнал падает до фонового уровня. Затем в активный центр попадает следующий нуклеотид, и цикл повторяется [135]. Используемая в этой технологии ДНК-полимераза фага  $\phi 29$  высокопроцессивна, скорость ее работы составляет около 10 нуклеотидов в секунду. Эта технология позволяет прочитывать длинные молекулы ДНК — до 10–20 тыс. п. о. — и имеет целый ряд практических приложений [136–142].

Другим вариантом мономолекулярного секвенирования является секвенирование с использованием мембран с нанопорами: если мембрану, содержащую такие поры, поместить в электрофоретическую ячейку, то одноцепочечные молекулы ДНК могут протягиваться через пору, при этом происходит изменение силы тока, проходящего через мембрану [113]. При таком протягивании в зависимости от типа нуклеотида происходит определенное по амплитуде и продолжительности изменение силы тока, что дает возможность определить, какой именно нуклеотид

находится в полости поры именно сейчас. В настоящее время существует только одна коммерческая серия компактных приборов, в которых реализована данная стратегия секвенирования (MinION компании Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Они распространяются в рамках программы раннего доступа [143]. К безусловным преимуществам нанопорового секвенирования относится возможность делать длинные прочтения без покупки дорогостоящего оборудования. В качестве недостатков можно отметить высокую частоту ошибок (12–20 %) [144]. Однако в настоящий момент все больше исследователей признают перспективность нанопорового секвенирования для метагеномных исследований, секвенирования небольших геномов, идентификации вирусных и бактериальных инфекционных агентов. Так, нанопоровое секвенирование успешно применяется для быстрой диагностики вирусных инфекций, таких как лихорадка Эбола или Чикунгунья, метагеномного изучения бактериального резистоста и даже прочтения полных, больших по объему, геномов [145–147].

### Основные стратегии идентификации патогенов с использованием NGS

Основными группами патогенов, представляющих наибольшую опасность для человека, являются бактерии и вирусы. Другие патогены, такие как грибы или протисты, не менее опасны, однако обычно не требуют генетического анализа для идентификации. На сегодняшний день основным приемом, позволяющим охарактеризовать разнообразие микроорганизмов в пробе, является метагеномный анализ. Подобный анализ стал возможным (и даже рутинным) благодаря разработке методов высокопроизводительного секвенирования. Биоразнообразие пробы можно охарактеризовать с помощью двух различных стратегий: таргетного секвенирования выбранных маркерных участков и полноценного тотального секвенирования метагенома.

Первый способ существенно проще технически, требует меньших временных и финансовых затрат на подготовку образцов, секвенирование и обработку данных. Однако он имеет существенное ограничение: позволяет провести только оценку разнообразия, тогда как второй способ позволяет получить исчерпывающую информацию о составе и генетических свойствах конкретного сообщества. Обычно в качестве маркерных участков в метагеномных образцах используются участки генов 16S или 18S rRNA у прокариот и эукариот соответственно или ITS-участки грибов [148–150]. Однако в зависимости от задачи маркерные участки могут быть и иными. К примеру, для характеристики резистоста в метагеномном образце нужно использовать участки генов устойчивости к антибиотикам.

Второй способ требует существенно больших временных и финансовых затрат, но при тотальном секвенировании метагеномов мы получаем полногеномные данные, представляющие собой различные фрагменты ДНК организмов, содержащихся в анализируемом метагеномном образце, на основе которых впоследствии можно будет собрать референсный геном [148]. Анализировать подобные данные можно тремя различными способами. Первый способ — сравнение определенных маркерных последовательностей генов с известными последовательностями базы данных для подобных генов определенных организмов [151–153]. Второй способ основан на кластеризации всех чтений образца по таксономическим группам, например, на основе их сходства с известными полногеномными

последовательностями [154–157]. Наконец, третий способ связан со сборкой полученных контигов в целые гены или даже геномы *de novo* [158, 159]. В случае с идентификацией новых патогенов группа методов анализа данных тотального секвенирования метагенома может быть наиболее важной, поскольку позволяет не только оценить биоразнообразие образца, но и идентифицировать в его составе отдельные гены.

Таким образом, оба подхода имеют свои достоинства и ограничения: секвенирование маркерных участков позволяет быстро и со сравнительно небольшими материальными затратами установить разнообразие генетического материала в образце, тогда как результаты тотального секвенирования метагенома позволяют получить исчерпывающую информацию о патогенных детерминантах (метатоксиком, метареизмом и пр.). Большая часть этой информации не будет представлять ценности, но позволит не упустить генетические элементы, обуславливающие эпидемическое значение патогенов в составе образца. Вероятно, возможно заменить полногеномный анализ сложным реагентным комплексом, состоящим из нескольких сотен олигонуклеотидных последовательностей, комплементарных наиболее важным и эпидемически значимым патогенным детерминантам, что позволит ускорить и удешевить процедуру метагеномной характеристики образца. Тогда использование тотального/полногеномного секвенирования может быть оправдано в отдельных сложных случаях уже после первичной детекции для подробной характеристики генетических особенностей смешанного образца или уже изолированного патогена.

### Особенности идентификации методами NGS вирусов и бактерий

Существующие методы NGS идеально подходят для анализа, идентификации и расшифровки генома выделенных в чистую культуру прокариотических организмов и открывают новые возможности в области идентификации неизвестных патогенов в смеси микроорганизмов. Определенную сложность при метагеномной характеристике образцов на предмет содержания в них прокариотических организмов представляют выявление фактов горизонтального переноса генов от одного члена метагенома к другому и корректное распределение информации по отдельным представителям микробного сообщества. Решением этих проблем для хромосомных генетических элементов является повышение степени покрытия отдельными ридями хромосомных последовательностей отдельных компонентов метагенома.

Фактором, определяющим качество получаемой в результате секвенирования информации, является пробоподготовка образца. Ее влияние можно проследить, анализируя особенности идентификации вирусов. Идентификация новых вирусов является трудной задачей. Основная причина этого — сложность отделения вирусной нуклеиновой кислоты от «мусорных» нуклеиновых кислот. Так, для крупных ДНК-вирусов выделение их нуклеиновой кислоты из вирусных частиц, полученных методом ультрафильтрации, приводит к существенному загрязнению образца так называемыми агентами переноса генов — не-вирусными ДНК, упакованными в вирусные капсиды [160]. В случае с маленькими высокоизменчивыми РНК-вирусами идентификация сложна вследствие как значительной примеси рРНК в образцах их нуклеиновой кислоты, так

и сложности подбора специфических вырожденных праймеров, которые бы носили универсальный характер и позволили амплифицировать вирусные кДНК хотя бы на уровне семейства [161]. В настоящий момент для выявления новых вирусов с помощью NGS чаще всего совмещают модифицированный вариант ПЦР (VIDISCA) с последующим высокопроизводительным секвенированием (рис. 3) [162].

Метод VIDISCA начинается с селективного обогащения образца вирусной нуклеиновой кислотой, которое включает центрифугирование для удаления остаточного клеточного дебриса и митохондрий. Кроме того, используется обработка препарата нуклеазами для удаления мешающей анализу хромосомной и митохондриальной ДНК и РНК из лизированных клеток. Добавление РНК-азы в образец приводит к деградации клеточной РНК, при этом вирусная нуклеиновая кислота не деградирует, поскольку инкапсидирована внутри вирусной частицы. В дальнейшем нуклеазы инактивируются, и вирусные нуклеиновые кислоты экстрагируют из образцов. При этом РНК в ходе обратной транскрипции переводится в кДНК, а затем синтезируется вторая нить с целью получения двуцепочечной ДНК (от вирусной РНК или ДНК генома) [163]. Двуцепочечные ДНК обрабатывают частотящими

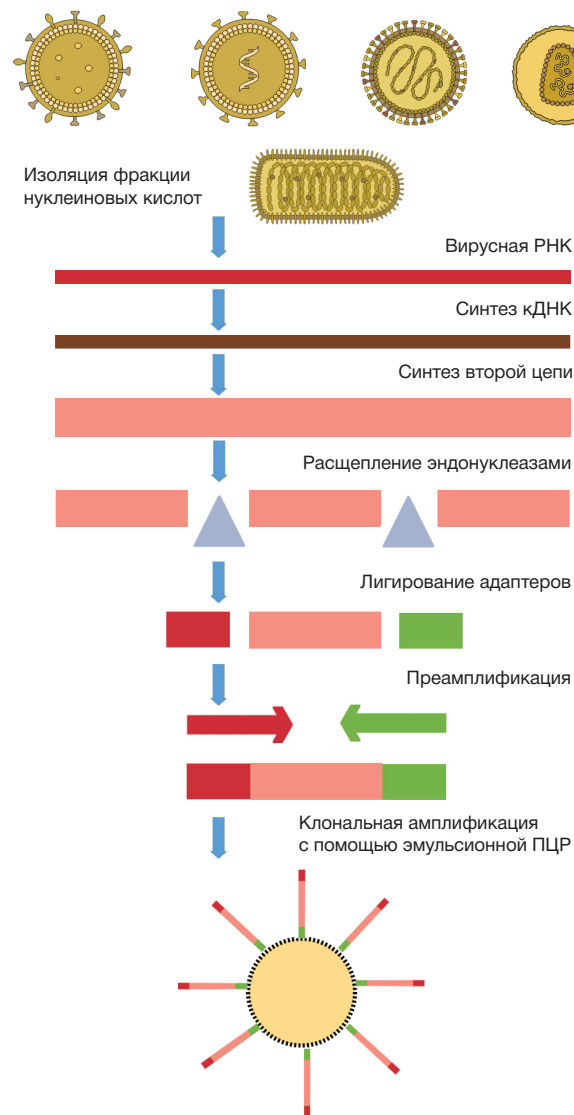


Рис. 3. Схема метода идентификации новых вирусных патогенов VIDISCA с использованием высокопроизводительного секвенирования

рестриктазами, специфичными для вирусных нуклеиновых кислот (HinfI и MseI), а затем расщепленную ДНК специфически лигируют с адаптером, содержащим липкие концы для вышеупомянутых рестриктаз. Целевые молекулы впоследствии амплифицируют с использованием праймеров, специфичных к адаптерным последовательностям, а затем проводится раунд селективного усиления с праймерами, удлиненными на один нуклеотид (G, A, T или C). Таким образом, используется 16 комбинаций праймеров, и каждый образец сравнивается с репрезентативным негативным контролем (незараженная сыворотка или плазма, а также супернатант неинфицированных культур). ПЦР-фрагменты, которые являются специфическими для «зараженных» клинических образцов, затем клонируют и секвенируют по Сэнгеру (клинический золотой стандарт).

Данная методика довольно трудоемка для исполнения, имеет низкую производительность и может обладать не самой высокой степенью воспроизводимости [163]. С целью повышения производительности данной технологии в настоящий момент пытаются создать ее модификацию, основанную на совмещении ПЦР с высокопроизводительным секвенированием: все амплифицированные фрагменты «сажают» на наночастицы и отправляют на массовое параллельное секвенирование. В оригинальной методике использовалось пиросеквенирование, лицензированное компанией Roshe. Однако в данном случае возникает серьезная проблема, т. к. в образцах обнаруживается низкое число прочтений вирусной нуклеиновой кислоты, вследствие чего обеспечивается слабое покрытие вирусного генома. Причиной этого является присутствие значительного количества клеточных рибосомальных РНК (рРНК) в пробах. Существует несколько подходов, позволяющих значительно снизить количество рРНК в пробах, такие как использование специально сконструированных рандомных праймеров, не отжигающихся на рРНК, использование частотящих рестриктаз, имеющих низкую частоту расщепления рРНК, и, наконец, использование специфических олигонуклеотидов для блокировки синтеза кДНК на рРНК [163]. Однако, несмотря на то, что все вышеупомянутые технические приемы позволяют существенно снизить число амплифицированных фрагментов рРНК, полученный результат все равно позволяет идентифицировать вирусы только в 50 % зараженных образцов. Тем не менее, если проблема с удалением рРНК из образцов будет полностью решена, данная методика станет одним

из наиболее быстрых и точных способов детекции ранее неизвестных вирусов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Появление новых бактерий и вирусов, угрожающих здоровью человека, является неизбежным процессом, отражающим общий ход биологической эволюции. Вирусы и бактерии являются наиболее генетически пластичными биологическими структурами благодаря таким молекулярным механизмам, как рекомбинация, реассортация и горизонтальный перенос генов. Наличие этих механизмов в сочетании с колоссальным потомством, а также селективное воздействие, которое зачастую возникает по вине самого человека, приводят к неизбежному появлению новых патогенов. Учитывая интенсивность взаимодействия людей из разных стран, распространение новых патогенных организмов представляет большую опасность. Снижение рисков возникновения эпидемий возможно только благодаря разработке новых методов контроля за распространением инфекций (вакцинация, лекарства, новые технологии стерилизации), а также методов выявления патогенов, которые должны учитывать их генетическую пластичность. Анализ имеющихся литературных данных показал, что на сегодняшний день не существует готовых коммерческих решений для идентификации организмов с новыми патогенными свойствами, а классические диагностические методы ПЦР и иммуноферментного анализа имеют существенные ограничения. Одним из ведущих методов идентификации широкого спектра патогенов, в том числе новых, и их генетических свойств становится высокопроизводительное секвенирование.

Высокопроизводительное секвенирование является одним из немногих доступных методов, способных не только детектировать конкретный патоген, но и подробно охарактеризовать его генетическую и эпигенетическую структуру, дать информацию о совокупности всех микроорганизмов образца, получая в результате исчерпывающий набор метагенетических данных. Необыкновенно быстрое развитие данной группы методов с каждым годом упрощает, удешевляет и убыстряет процедуру анализа. Разнообразие программного обеспечения и различных приложений позволяет решать с помощью этого метода самые разные задачи, в том числе задачу эффективной идентификации ранее неизвестных патогенов.

## Литература

1. Lee N, Hui D, Wu A, Chan P, Cameron P, Joynt GM, et al. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med.* 2003 May 15; 348 (20): 1986–94. DOI: 10.1056/NEJMoa030685.
2. Poutanen SM, Low DE, Henry B, Finkelshein S, Rose D, Green K, et al. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. *N Engl J Med.* 2003 May 15; 348 (20): 1995–2005. DOI: 10.1056/NEJMoa030634.
3. Tsang KW, Ho PL, Ooi GC, Yee WK, Wang T, Chan-Yeung M, et al. A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med.* 2003 May 15; 348 (20): 1977–85. DOI: 10.1056/NEJMoa030666.
4. Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med.* 2003 May 15; 348 (20): 1967–76. DOI: 10.1056/NEJMoa030747.
5. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med.* 2003 May 15; 348 (20): 1953–66. DOI: 10.1056/NEJMoa030781.
6. Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LY, Lim W, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet.* 2003 Apr 19; 361 (9366): 1319–25. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)13077-2.
7. Surjit M, Kumar R, Mishra RN, Reddy MK, Chow VT, Lal SK. The severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein is phosphorylated and localizes in the cytoplasm by 14-3-3-mediated translocation. *J Virol.* 2005 Sep; 79 (17): 11476–86. DOI: 10.1128/JVI.79.17.11476-11486.2005.
8. Marra MA, Jones SJ, Astell CR, Holt RA, Brooks-Wilson A, Butterfield YS, et al. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science.* 2003 May 30; 300 (5624):



- 1399–404. DOI: 10.1126/science.1085953.
9. Song HD, Tu CC, Zhang GW, Wang SY, Zheng K, Lei LC, et al. Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb 15; 102 (7): 2430–5. DOI: 10.1073/pnas.0409608102.
10. Zhao GP. SARS molecular epidemiology: A Chinese fairy tale of controlling an emerging zoonotic disease in the genomics era. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2007 Jun 29; 362 (1482): 1063–81. DOI: 10.1098/rstb.2007.2034.
11. Cleri DJ, Ricketti AJ, Vernaleo JR. Severe acute respiratory syndrome (SARS). *Infect Dis Clin North Am*. 2010 Mar; 24 (1): 175–202. DOI: 10.1016/j.idc.2009.10.005.
12. Cheng VC, Chan JF, To KK, Yuen KY. Clinical management and infection control of SARS: lessons learned. *Antiviral Res*. 2013 Nov; 100 (2): 407–19. DOI: 10.1016/j.antiviral.2013.08.016.
13. Pyrc K, Berkhout B, van der Hoek L. The novel human coronaviruses NL63 and HKU1. *J Virol*. 2007 Apr; 81 (7): 3051–7. DOI: 10.1128/JVI.01466-06.
14. Lau SK, Li KS, Huang Y, Shek CT, Tse H, Wang M, et al. Ecoepidemiology and complete genome comparison of different strains of severe acute respiratory syndrome-related Rhinolphus bat coronavirus in China reveal bats as a reservoir for acute, self-limiting infection that allows recombination events. *J Virol*. 2010 Mar; 84 (6): 2808–19. DOI: 10.1128/JVI.02219-09.
15. van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, et al. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med*. 2004 Apr; 10 (4): 368–73. DOI: 10.1038/nm1024.
16. Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, Wong BH, et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol*. 2005 Jan; 79 (2): 884–95. DOI: 10.1128/JVI.79.2.884-895.2005.
17. Goes LG, Durigon EL, Campos AA, Hein N, Passos SD, Jerez JA. Coronavirus HKU1 in children, Brazil, 1995. *Emerg Infect Dis*. 2011 Jun; 17 (6): 1147–8. DOI: 10.3201/eid1706.101381.
18. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med*. 2012 Nov 8; 367 (19): 1814–20. DOI: 10.1056/NEJMoa1211721.
19. de Groot RJ, Baker SC, Baric RS, Brown CS, Drosten C, Enjuanes L, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): Announcement of the Coronavirus Study Group. *J Virol*. 2013 Jul; 87 (14): 7790–2. DOI: 10.1128/JVI.01244-13.
20. World Health Organisation Global Alert and Response (GAR), MERS-CoV summary updates. Available from: [http://www.who.int/csr/disease/coronavirus\\_infections/archive\\_updates/en/](http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/archive_updates/en/).
21. Assiri A, McGeer A, Perl TM, Price CS, Al Rabeeah AA, Cummings DA, et al. Hospital outbreak of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *N Engl J Med*. 2013 Aug 1; 369 (5): 407–16. DOI: 10.1056/NEJMoa1306742.
22. Assiri A, Al-Tawfiq JA, Al-Rabeeh AA, Al-Rabiah FA, Al-Hajjar S, Al-Barrak A, et al. Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease from Saudi Arabia: A descriptive study. *Lancet Infect Dis*. 2013 Sep; 13 (9): 752–61. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70204-4.
23. Mailles A, Blanckaert K, Chaud P, van der Werf S, Lina B, Caro V, et al. First cases of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) infections in France, investigations and implications for the prevention of human-to-human transmission, France, May 2013. *Euro Surveill*. 2013 Jun 13; 18 (24). pii: 20502.
24. de Sousa R, Reusken C, Koopmans M. MERS coronavirus: Data gaps for laboratory preparedness. *J Clin Virol*. 2014 Jan; 59 (1): 4–11. DOI: 10.1016/j.jcv.2013.10.030.
25. Breban R, Riou J, Fontanet A. Interhuman transmissibility of Middle East respiratory syndrome coronavirus: estimation of pandemic risk. *Lancet*. 2013 Aug 24; 382 (9893): 694–9. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61492-0.
26. Coleman CM, Frieman MB. Coronaviruses: Important Emerging Human Pathogens. *J Virol*. 2014 May; 88 (10): 5209–12. DOI: 10.1128/JVI.03488-13.
27. Hui DS, Zumla A. Advancing priority research on the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J Infect Dis*. 2014 Jan 15; 209 (2): 173–6. DOI: 10.1093/infdis/jit591.
28. Memish ZA, Zumla AI, Al-Hakeem RF, Al-Rabeeh AA, Stephens GM. Family cluster of Middle East respiratory syndrome coronavirus infections. *N Engl J Med*. 2013 Jun 27; 368 (26): 2487–94. DOI: 10.1056/NEJMoa1303729.
29. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med*. 2001 Jun; 7 (6): 719–24. DOI: 10.1038/89098.
30. de Graaf M, Osterhaus AD, Fouchier RA, Holmes EC. Evolutionary dynamics of human and avian metapneumoviruses. *J Gen Virol*. 2008 Dec; 89 (Pt 12): 2933–42. DOI: 10.1099/vir.0.2008/006957-0.
31. Yang CF, Wang CK, Tollefson SJ, Piyaratna R, Lintao LD, Chu M, et al. Genetic diversity and evolution of human metapneumovirus fusion protein over twenty years. *Virol J*. 2009 Sep 9; 6: 138. DOI: 10.1186/1743-422X-6-138.
32. Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, Halburnt-Rush LL, Pingsterhaus JM, Edwards KM, et al. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med*. 2004 Jan 29; 350 (5): 443–50. DOI: 10.1056/NEJMoa025472.
33. Esper F, Martinello RA, Boucher D, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, et al. A 1-year experience with human metapneumovirus in children aged <5 years. *J Infect Dis*. 2004 Apr 15; 189 (8): 1388–96. DOI: 10.1086/382482.
34. Edwards KM, Zhu Y, Griffin MR, Weinberg GA, Hall CB, Szilagyi PG, et al. New Vaccine Surveillance, N. Burden of human metapneumovirus infection in young children. *N Engl J Med*. 2013 Feb 14; 368 (7): 633–43. DOI: 10.1056/NEJMoa1204630.
35. Semple MG, Cowell A, Dove W, Greensill J, McNamara PS, Halfhide C, et al. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. *J Infect Dis*. 2005 Feb 1; 191 (3): 382–6. DOI: 10.1086/426457.
36. van den Hoogen BG, van Doornum GJ, Fockens JC, Cornelissen JJ, Beyer WE, de Groot R, et al. Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients. *J Infect Dis*. 2003 Nov 15; 188 (10): 1571–7. DOI: 10.1086/379200.
37. Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, Givney RC, Ratcliff RM. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS Pathog*. 2009 Apr; 5 (4): e1000391. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000391.
38. Kapoor A, Slikas E, Simmonds P, Chiochansin T, Naeem A, Shaikat S, et al. A newly identified bocavirus species in human stool. *J Infect Dis*. 2009 Jan 15; 199 (2): 196–200. DOI: 10.1086/595831.
39. Kapoor A, Simmonds P, Slikas E, Li L, Bodhidatta L, Sethabutr O, et al. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *J Infect Dis*. 2010 Jun 1; 201 (11): 1633–43. DOI: 10.1086/652416.
40. von Linstow ML, Hwugh M, Hwugh B. Clinical and epidemiologic characteristics of human bocavirus in Danish infants: Results from a prospective birth cohort study. *Pediatr Infect Dis J*. 2008 Oct; 27 (10): 897–902. DOI: 10.1097/INF.0b013e3181757b16.
41. Jartti T, Hedman K, Jartti L, Ruuskanen O, Allander T, Soderlund-Venermo M. Human bocavirus — the first 5 years. *Rev Med Virol*. 2012 Jan; 22 (1): 46–64. DOI: 10.1002/rmv.720.
42. Vicente D, Cilla G, Montes M, Pérez-Yarza EG, Pérez-Trallero E. Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerg Infect Dis*. 2007 Apr; 13 (4): 636–7. DOI: 10.3201/eid1304.061501.
43. Huang Q, Deng X, Yan Z, Cheng F, Luo Y, Shen W, et al. Establishment of a reverse genetics system for studying human bocavirus in human airway epithelia. *PLoS Pathog*. 2012; 8 (8): e1002899. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002899.
44. Deng X, Li Y, Qiu J. Human bocavirus 1 infects commercially available primary human airway epithelium cultures productively. *J Virol Methods*. 2014 Jan; 195: 112–9. DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.10.012.
45. Dijkman R, Koekkoek SM, Molenkamp R, Schildgen O, van der

- Hoek L. Human bocavirus can be cultured in differentiated human airway epithelial cells. *J Virol*. 2009 Aug; 83 (15): 7739–48. DOI: 10.1128/JVI.00614-09.
46. Chow BD, Ou Z, Esper FP. Newly recognized bocaviruses (HBoV, HBoV2) in children and adults with gastrointestinal illness in the United States. *J Clin Virol*. 2010 Feb; 47 (2): 143–7. DOI: 10.1016/j.jcv.2009.11.030.
  47. Han TH, Kim CH, Park SH, Kim EJ, Chung JY, Hwang ES. Detection of human bocavirus-2 in children with acute gastroenteritis in South Korea. *Arch Virol*. 2009; 154 (12): 1923–7. DOI: 10.1007/s00705-009-0533-3.
  48. Santos N, Peret TC, Humphrey CD, Albuquerque MC, Silva RC, Benati FJ, et al. Human bocavirus species 2 and 3 in Brazil. *J Clin Virol*. 2010 Jun; 48 (2): 127–30. DOI: 10.1016/j.jcv.2010.03.014.
  49. Song JR, Jin Y, Xie ZP, Gao HC, Xiao NG, Chen WX, et al. Novel human bocavirus in children with acute respiratory tract infection. *Emerg Infect Dis*. 2010 Feb; 16 (2): 324–7. DOI: 10.3201/eid1602.090553.
  50. Han TH, Chung JY, Hwang ES. Human bocavirus 2 in children, South Korea. *Emerg Infect Dis*. 2009 Oct; 15 (10): 1698–700. DOI: 10.3201/eid1510.090337.
  51. Regamey N, Frey U, Deffernez C, Latzin P, Kaiser L; Swiss Paediatric Respiratory Research Group. Isolation of human bocavirus from Swiss infants with respiratory infections. *Pediatr Infect Dis J*. 2007 Feb; 26 (2): 177–9. DOI: 10.1097/01.inf.0000250623.43107.bc.
  52. Schildgen O, Möller A, Allander T, Mackay IM, Völz S, Kupfer B, et al. Human bocavirus: passenger or pathogen in acute respiratory tract infections? *Clin Microbiol Rev*. 2008 Apr; 21 (2): 291–304. DOI: 10.1128/CMR.00030-07.
  53. Bastien N, Brandt K, Dust K, Ward D, Li Y. Human bocavirus infection, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2006 May; 12 (5): 848–50. DOI: 10.3201/eid1205.051424.
  54. Kupfer B, Vehreschild J, Cornely O, Kaiser R, Plum G, Viazov S, et al. Severe pneumonia and human bocavirus in adult. *Emerg Infect Dis*. 2006 Oct; 12 (10): 1614–6. DOI: 10.3201/eid1210.060520.
  55. Allander T. Human bocavirus. *J Clin Virol*. 2008 Jan; 41 (1): 29–33. DOI: 10.1016/j.jcv.2007.10.026.
  56. Manning A, Russell V, Eastick K, Leadbetter GH, Hallam N, Templeton K, et al. Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses. *J Infect Dis*. 2006 Nov 1; 194 (9): 1283–90. DOI: 10.1086/508219.
  57. Longtin J, Bastien M, Gilca R, Leblanc E, de Serres G, Bergeron MG, et al. Human bocavirus infections in hospitalized children and adults. *Emerg Infect Dis*. 2008 Feb; 14 (2): 217–21. DOI: 10.3201/eid1402.070851.
  58. Fry AM, Lu X, Chittaganpitch M, Peret T, Fischer J, Dowell SF, et al. Human bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand. *J Infect Dis*. 2007 Apr 1; 195 (7): 1038–45. DOI: 10.1086/512163.
  59. Arnold JC, Singh KK, Spector SA, Sawyer MH. Human bocavirus: prevalence and clinical spectrum at a children's hospital. *Clin Infect Dis*. 2006 Aug 1; 43 (3): 283–8. DOI: 10.1086/505399.
  60. Kesebir D, Vazquez M, Weibel C, Shapiro ED, Ferguson D, Landry ML, et al. Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J Infect Dis*. 2006 Nov 1; 194 (9): 1276–82. DOI: 10.1086/508213.
  61. Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia, USA: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007. P. 1691–1740.
  62. Ludwig S, Stitz L, Planz O, Van H, Fitch WM, Scholtissek C. European swine virus as a possible source for the next influenza pandemic? *Virology*. 1995 Oct 1; 212 (2): 555–61. DOI: 10.1006/viro.1995.1513.
  63. Peiris JS, de Jong MD, Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Apr; 20 (2): 243–67. DOI: 10.1128/CMR.00037-06.
  64. Sharma S, Mayank A, Lal SK. Molecular events leading to the creation of a pandemic influenza virus. *Indian J Microbiol*. 2009 Dec; 49 (4): 332–8. DOI: 10.1007/s12088-009-0059-0.
  65. Ito T, Couceiro JN, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol*. 1998 Sep; 72 (9): 7367–73.
  66. Kasowski EJ, Garten RJ, Bridges CB. Influenza pandemic epidemiologic and virologic diversity: reminding ourselves of the possibilities. *Clin Infect Dis*. 2011 Jan 1; 52 Suppl 1: S44–9. DOI: 10.1093/cid/ciq010.
  67. Brockwell-Staats C, Webster RG, Webby RJ. Diversity of influenza viruses in swine and the emergence of a novel human pandemic influenza A (H1N1). *Influenza Other Respir Viruses*. 2009 Sep; 3 (5): 207–13. DOI: 10.1111/j.1750-2659.2009.00096.
  68. Dawood FS, Iuliano AD, Reed C, Meltzer MI, Shay DK, Cheng PY, et al. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. *Lancet Infect Dis*. 2012 Sep; 12 (9): 687–95. DOI: 10.1016/S1473-3099(12)70121-4.
  69. To KK, Chan JF, Chen H, Li I, Yuen KY. The emergence of influenza A H7N9 in human beings 16 years after influenza A H5N1: a tale of two cities. *Lancet Infect Dis*. 2013 Sep; 13 (9): 809–21. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70167-1.
  70. Chang SY, Lin PH, Tsai JC, Hung CC, Chang SC. The first case of H7N9 influenza in Taiwan. *Lancet*. 2013 May 11; 381 (9878): 1621. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60943-5.
  71. Pary J. H7N9 avian flu infects humans for the first time. *BMJ*. 2013 Apr 4; 346: f2151. DOI: 10.1136/bmj.f2151.
  72. Nicoll A, Danielsson N. A novel reassortant avian influenza A (H7N9) virus in China—what are the implications for Europe. *Euro Surveill*. 2013 Apr 11; 18 (15): 20452.
  73. Hirst M, Astell CR, Griffith M, Coughlin SM, Moksa M, Zeng T, et al. Novel avian influenza H7N3 strain outbreak, British Columbia. *Emerg Infect Dis*. 2004 Dec; 10 (12): 2192–5. DOI: 10.3201/eid1012.040743.
  74. Koopmans M, Wilbrink B, Conyn M, Natrop G, van der Nat H, Vennema H, et al. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet*. 2004 Feb 21; 363 (9409): 587–93. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)15589-X.
  75. Du Ry van Beest Holle M, Meijer A, Koopmans M, de Jager CM. Human-to-human transmission of avian influenza A/H7N7, The Netherlands, 2003. *Euro Surveill*. 2005 Dec; 10 (12): 264–8.
  76. Li Q, Zhou L, Zhou M, Chen Z, Li F, Wu H, et al. Epidemiology of human infections with avian influenza A (H7N9) virus in China. *N Engl J Med*. 2014 Feb 6; 370 (6): 520–32. DOI: 10.1056/NEJMoa1304616.
  77. Jonges M, Meijer A, Fouchier RA, Koch G, Li J, Pan JC, et al. Guiding outbreak management by the use of influenza A(H7Nx) virus sequence analysis. *Euro Surveill*. 2013 Apr 18; 18 (16): 20460.
  78. Muniesa M, Hammerl JA, Hertwig S, Appel B, Brüssow H. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: a new challenge for microbiology. *Appl Environ Microbiol*. 2012 Jun; 78 (12): 4065–73. DOI: 10.1128/AEM.00217-12.
  79. Mariani-Kurkdjian P, Bingen E, Gault G, Jourdan-Da Silva N, Weill FX. *Escherichia coli* O104:H4 south-west France, June 2011. *Lancet Infect Dis*. 2011 Oct; 11 (10): 732–3. DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70266-3.
  80. Werber D, Mason BW, Evans MR, Salmon RL. Preventing household transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 infection: promptly separating siblings might be the key. *Clin Infect Dis*. 2008 Apr 15; 46 (8): 1189–96. DOI: 10.1086/587670.
  81. Aldabe B, Delmas Y, Gault G, Vendrely B, Llanas B, Charron M, et al. Household transmission of haemolytic uraemic syndrome associated with *Escherichia coli* O104:H4, south-western France, June 2011. *Euro Surveill*. 2011 Aug 4; 16 (31): pii: 19934.
  82. Kuijper EJ, Soonawala D, Vermont C, van Dissel JT. Household transmission of haemolytic uraemic syndrome associated with *Escherichia coli* O104:H4 in the Netherlands, May 2011. *Euro Surveill*. 2011 Jun 23; 16 (25): pii: 19897.
  83. Hauri A, Gotsch U, Strotmann I, Krahn J, Bettge-Weller G, Westbrock H, et al. Secondary transmissions during the outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104 in Hesse, Germany, 2011. *Euro Surveill*. 2011 Aug 4; 16 (31): pii: 19937.

84. Brzuszkiewicz E, Thürmer A, Schuldes J, Leimbach A, Liesegang H, Meyer FD, et al. Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: entero-aggregative-haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Arch Microbiol.* 2011 Dec; 193 (12): 883–91. DOI: 10.1007/s00203-011-0725-6.
85. Mellmann A, Harsen D, Cummings CA, Zentz EB, Leopold SR, Rico A, et al. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS One.* 2011; 6 (7): e22751. DOI: 10.1371/journal.pone.0022751.
86. Rasko DA, Webster DR, Sahl JW, Bashir A, Boisen N, Scheut F, et al. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. *N Engl J Med.* 2011 Aug 25; 365 (8): 709–17. DOI: 10.1056/NEJMoa1106920.
87. Mossoro C, Glaziou P, Yassibanda S, Lan NT, Bekondi C, Minssart P, et al. Chronic diarrhea, hemorrhagic colitis, and hemolytic-uremic syndrome associated with HEP-2 adherent *Escherichia coli* in adults infected with human immunodeficiency virus in Bangui, Central African Republic. *J Clin Microbiol.* 2002 Aug; 40 (8): 3086–8.
88. Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, Bauwens A, et al. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis.* 2011 Sep; 11 (9): 671–6. DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70165-7.
89. Gaynes R, Edwards JR; National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis.* 2005 Sep 15; 41 (6): 848–54.
90. Neuhauser MM, Weinstein RA, Rydman R, Danziger LH, Karam G, Quinn JP. Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use. *JAMA.* 2003 Feb 19; 289 (7): 885–8.
91. Lee K, Lee HS, Jang SJ, Park AJ, Lee MH, Song WK, et al. Antimicrobial resistance surveillance of bacteria in 1999 in Korea with a special reference to resistance of enterococci to vancomycin and gram-negative bacilli to third generation cephalosporin, imipenem, and fluoroquinolone. *J Korean Med Sci.* 2001 Jun; 16 (3): 262–70. DOI: 10.3346/jkms.2001.16.3.262.
92. Dubois V, Arpin C, Melon M, Melon B, Andre C, Frigo C, et al. Nosocomial outbreak due to a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12: efficacy of cefepime-amikacin therapy and analysis of beta-lactam resistance. *J Clin Microbiol.* 2001 Jun; 39 (6): 2072–8. DOI: 10.1128/JCM.39.6.2072-2078.2001.
93. Rhomborg PR, Jones RN. Contemporary activity of meropenem and comparator broad-spectrum agents: MYSTIC program report from the United States component (2005). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007 Feb; 57 (2): 207–15. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2006.07.009.
94. Agodi A, Zarilli R, Barchitta M, Anzaldi A, Di Popolo A, Mattaliano A, et al. Alert surveillance of intensive care unit-acquired *Acinetobacter* infections in a Sicilian hospital. *Clin Microbiol Infect.* 2006 Mar; 12 (3): 241–7. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2005.01339.x.
95. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin Infect Dis.* 2001 May 15; 32 Suppl 2: S94–103. DOI: 10.1086/320182.
96. Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, Mohapatra S, Casellas JM, Goossens H, et al. Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of production of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Infect Dis.* 2004 Jun 1; 39 (1): 31–7. DOI: 10.1086/420816.
97. Wright GD, Poinar H. Antibiotic resistance is ancient: implications for drug discovery. *Trends Microbiol.* 2012 Apr; 20 (4): 157–9. DOI: 10.1016/j.tim.2012.01.002.
98. D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, et al. Antibiotic resistance is ancient. *Nature.* 2011 Aug 31; 477 (7365): 457–61. DOI: 10.1038/nature10388.
99. Wybenga-Groot LE, Draker K, Wright GD, Berghuis AM. Crystal structure of an aminoglycoside 60-N-acetyltransferase: defining the GCN5-related N-acetyltransferase superfamily fold. *Structure.* 1999 May; 7 (5): 497–507.
100. Bhullar K, Wagelchner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, et al. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One.* 2012; 7 (4): e34953. DOI: 10.1371/journal.pone.0034953.
101. Hon WC, McKay GA, Thompson PR, Sweet RM, Yang DS, Wright GD, et al. Structure of an enzyme required for aminoglycoside antibiotic resistance reveals homology to eukaryotic protein kinases. *Cell.* 1997 Jun 13; 89 (6): 887–95.
102. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat Park CH, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med.* 2006 Jan; 12 (1): 83–8. DOI: 10.1038/nm1347.
103. Barlow M, Hall BG. Origin and evolution of the AmpC betalactamases of *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 May; 46 (5): 1190–8.
104. Koskiniemi S, Pranting M, Gullberg E, Näsval J, Andersson DI. Activation of cryptic aminoglycoside resistance in *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol.* 2011 Jun; 80 (6): 1464–78. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07657.x.
105. Lindsay JA. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol.* 2010 Feb; 300 (2–3): 98–103. DOI: 10.1016/j.ijmm.2009.08.013.
106. Moore AM, Munck C, Sommer MO, Dantas G. Functional metagenomic investigations of the human intestinal microbiota. *Front Microbiol.* 2011 Oct 17; 2: 188. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00188.
107. Moore AM, Patel S, Forsberg KJ, Wang B, Bentley G, Razia Y, et al. Pediatric fecal microbiota harbor diverse and novel antibiotic resistance genes. *PLoS One.* 2013 Nov 13; 8 (11): e78822. DOI: 10.1371/journal.pone.0078822.
108. Taur Y, Xavier JB, Lipuma L, Ubeda C, Goldberg J, Gbourne A, et al. Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis.* 2012 Oct; 55 (7): 905–14. DOI: 10.1093/cid/cis580.
109. Smillie CS, Smith MB, Friedman J, Cordero OX, David LA, Alm EJ. Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome. *Nature.* 2011 Oct; 480 (7376): 241–4. DOI: 10.1038/nature10571.
110. Jiang HX, Tang D, Liu YH, Zhang XH, Zeng ZL, Xu L, et al. Prevalence and characteristics of beta-lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from farmed fish in China. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67 (10): 2350–3. DOI: 10.1093/jac/dks250.
111. Holvoet K, Sompers I, Callens B, Dewulf J, Uyttendaele M. Moderate prevalence of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from lettuce, irrigation water, and soil. *Appl Environ Microbiol.* 2013 Nov; 79 (21): 6677–83. DOI: 10.1128/AEM.01995-13.
112. McNeece G, Naughton V, Woodward MJ, Dooley JS, Naughton PJ. Array based detection of antibiotic resistance genes in Gram-negative bacteria isolated from retail poultry meat in the UK and Ireland. *Int J Food Microbiol.* 2014 Jun 2; 179: 24–32. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.019.
113. Diarra MS, Delaquis P, Rempel H, Bach S, Harlton C, Aslam M, et al. Antibiotic resistance and diversity of *Salmonella enterica* serovars associated with broiler chickens. *J Food Prot.* 2014 Jan; 77 (1): 40–9. DOI: 10.4315/0362-028.JFP-13-251.
114. Zhu YG, Johnson TA, Su JQ, Qiao M, Guo GX, Stedtfeld RD, et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Feb 26; 110 (9): 3435–40. DOI: 10.1073/pnas.1222743110.
115. Lim DV, Simpson JM, Kearns EA, Kramer MF. Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare. *Clin Microbiol Rev.* 2005 Oct; 18 (4): 583–607. DOI: 10.1128/CMR.18.4.583-607.2005.
116. Bell CA, Uhl JR, Hadfield TL, David JC, Meyer RF, Smith TF, et al. Detection of *Bacillus anthracis* DNA by LightCycler PCR. *J Clin Microbiol.* 2002 Aug; 40 (8): 2897–902.
117. Fode-Vaughan KA, Maki JS, Benson JA, Collins ML. Direct PCR



- detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol*. 2003; 37 (3): 239–43.
118. Ibekwe AM, Grieve CM. Detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in environmental samples by real-time PCR. *J Appl Microbiol*. 2003; 94 (3): 421–31.
  119. Garcia ME, Blanco JL, Caballero J, Gargallo-Viola D. Anticoagulants interfere with PCR used to diagnose invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2002 Apr; 40 (4): 1567–8.
  120. Morata P, Queipo-Ortuno MI, de Dios Colmenero J. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol*. 1998 Sep; 36 (9): 2443–6.
  121. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome Sequencing in Open Microfabricated High Density Picoliter Reactors. *Nature*. 2005 Sep 15; 437 (7057): 376–80. DOI: 10.1038/nature03959.
  122. Droege M, Hill B. The Genome Sequencer FLX System—longer reads, more applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets. *J Biotechnol*. 2008 Aug 31; 136 (1–2): 3–10. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2008.03.021.
  123. Roche Shutting Down 454 Sequencing Business [Internet]. Genome Web LLC. c2016 — [cited 2017 Feb]. Available from: <https://www.genomeweb.com/sequencing/roche-shutting-down-454-sequencing-business>.
  124. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 2011 Jul 2; 475 (7356): 348–52. DOI: 10.1038/nature10242.
  125. New Ion S5 and Ion S5 XL NGS Systems for Targeted Sequencing [Internet]. Available from: <http://www.thermofisher.com/ru/ru/home/products-and-services/promotions/ion-s5-ngs.html?CID=fl-ions5>.
  126. Heger M. Thermo Fisher Launches New Systems to Focus on Plug and Play Targeted Sequencing. Genome Web LLC [Internet]. 2015 Sep 01 [cited 2017 Feb]. Available from: <https://www.genomeweb.com/sequencing-technology/thermo-fisher-launches-new-systems-focus-plug-and-play-targeted-sequencing>.
  127. Shaikh-Lesko R. Sequencing on the Seven Seas. The Scientist [Internet]. 2014 Aug 01 [cited 2017 Feb]. Available from: <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/40556/title/Sequencing-on-the-Seven-Seas/>.
  128. Ma Z, Lee RW, Li B, Kenney P, Wang Y, Erikson J, et al. Isothermal amplification method for next-generation sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Aug 27; 110 (35): 14320–3. DOI: 10.1073/pnas.1311334110.
  129. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*. 2008 Nov 6; 456 (7218): 53–9. DOI: 10.1038/nature07517.
  130. Luo C, Tsementzi D, Kyripides N, Read T, Kostantinidis KT. Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample. *PLoS One*. 2012; 7 (2): e30087. DOI: 10.1371/journal.pone.0030087.
  131. Nakamura K, Oshima T, Morimoto T, Ikeda S, Yoshikawa H, Shiwa Y, et al. Sequence-specific error profile of Illumina sequencers. *Nucleic Acids Res*. 2011 Jul; 39 (13): e90. DOI: 10.1093/nar/gkr344.
  132. Dohm JC, Lottaz C, Borodina T, Himmelbauer H. Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing. *Nucleic Acids Res*. 2008; 36 (16): e105. DOI: 10.1093/nar/gkn425.
  133. Kebschull JM, Zador AM. Sources of PCR-induced distortions in high-throughput sequencing data sets. *Nucleic Acids Res*. 2015 Dec 2; 43 (21): e143. DOI: 10.1093/nar/gkv717.
  134. Aird D, Ross MG, Chen WS, Danielsson M, Fennel T, Russ C, et al. Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. *Genome Biol*. 2011; 12 (2): R18. DOI: 10.1186/gb-2011-12-2-r18.
  135. Thompson JF, Milos PM. The properties and applications of single-molecule DNA sequencing. *Genome Biol*. 2011; 12 (2): 217. DOI: 10.1186/gb-2011-2-217.
  136. Ozsolak F, Platt AR, Jones DR, Reifemberger JG, Sass LE, McInerney P, et al. Direct RNA sequencing. *Nature*. 2009 Oct 8; 461 (7265): 814–8. DOI: 10.1038/nature08390.
  137. Battered Helicos BioSciences Corporation (HLCS) Files for Chapter 11. BioSpace [Internet]. 2012 Nov 16 [cited 2017 Feb]. Available from: <http://www.biospace.com/News/battered-helicos-biosciences-corporation-files-for/280101>.
  138. Eid J, Fehr A, Gray J, Luong K, Lyle J, Otto G, et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science*. 2009 Jan 2; 323 (5910): 133–8. DOI: 10.1126/science.1162986.
  139. Flusberg BA, Webster DR, Lee JH, Travers KJ, Olivares EC, Clark TA, et al. Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. *Nat Methods*. 2010 Jun; 7 (6): 461–5. DOI: 10.1038/nmeth.1459.
  140. Travers KJ, Chin CS, Rank DR, Eid JS, Turner SW. A flexible and efficient template format for circular consensus sequencing and SNP detection. *Nucleic Acids Res*. 2010 Aug; 38 (15): e159. DOI: 10.1093/nar/gkq543.
  141. Pacific Biosciences Launches New Sequencing Platform Based on Its SMRT Technology. Pacific Biosciences [Internet]. 2015 Sep 30 [cited 2017 Feb]. Available from: <http://investor.pacificbiosciences.com/releasedetail.cfm?releaseid=934581>.
  142. Kasianowicz JJ, Brandin E, Branton D, Deamer DW. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 26; 93 (24): 13770–3.
  143. Check Hayden E. Pint-sized DNA sequencer impresses first users. *Nature*. 2015 May 7; 521 (7550): 15–6. DOI: 10.1038/521015a.
  144. Mikheyev AS, Tin MM. A first look at the Oxford Nanopore MinION sequencer. *Mol Ecol Resour*. 2014 Nov; 14 (6): 1097–102.
  145. Greninger AL, Naccache SN, Federman S, Yu G, Mbala P, Bres V, et al. Rapid metagenomic identification of viral pathogens in clinical samples by real-time nanopore sequencing analysis. *Genome Med*. 2015 Sep 29; 7: 99. DOI: 10.1186/s13073-015-220-9.
  146. Cao MD, Ganesamoorthy D, Elliott AG, Zhang H, Cooper MA, Coin LJ, et al. Real-time strain typing and analysis of antibiotic resistance potential using Nanopore MinION sequencing. 2016 Jul 26; 5 (1): 32. DOI: 10.1186/s13742-016-0137-2.
  147. *Solanum pennellii* (new cultivar) — PlabiPD [Internet]. Aachen, Germany: IBG-2 Forschungszentrum Jülich, Institute of Biology-1 RWTH. c2014–2017 [cited 2017 Feb]. Available from: <http://www.plabipd.de/portal/solanum-pennellii>.
  148. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, et al. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Jul; 72 (7): 5069–72. DOI: 10.1128/AEM.03006-05.
  149. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics*. 2009 Jul 15; 25 (14): 1754–60. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp324.
  150. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol*. 2009; 10 (3): R25. DOI: 10.1186/gb-2009-10-3-r25.
  151. Liu B, Gibbons T, Ghodsi M, Ghodsi M, Treangen T, Pop M. Accurate and fast estimation of taxonomic profiles from metagenomic shotgun sequences. *BMC Genomics*. 2011; 12 Suppl 2: S4. DOI: 10.1186/1471-2164-12-S2-S4.
  152. Segata N, Waldron L, Ballarín A, Narasimhan V, Jousson O, Huttenhower C. Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes. *Nat Methods*. 2012 Jun 10; 9 (8): 811–4. DOI: 10.1038/nmeth.2066.
  153. Wu M, Eisen JA. A simple, fast, and accurate method of phylogenomic inference. *Genome Biol*. 2008 Oct 13; 9 (10): R151. DOI: 10.1186/gb-2008-9-10-r151.
  154. Sharpton TJ, Riesenfeld SJ, Kembel SW, Ladau J, O'Dwyer JP, Green JL, et al. PhyloT: a high-throughput procedure quantifies microbial community diversity and resolves novel taxa from metagenomic data. *PLoS Comput Biol*. 2011 Jan 20; 7 (1): e1001061. DOI: 10.1371/journal.pcbi.10001061.
  155. Huson DH, Mitra S, Ruscheweyh H, Weber N, Schuster SC. Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4. *Genome Res*. 2011 Sep; 21 (9): 1552–60. DOI: 10.1101/



gr.120618.111.

156. Meyer F, Paarmann D, D'Souza M, Olson R, Glass EM, Kubal M, et al. The metagenomics RAST server — a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics*. 2008 Sep 19; 9: 386. DOI: 10.1186/1471-2105-9-386.
157. Gerlach W, Stoye J. Taxonomic classification of metagenomic shotgun sequences with CARMA3. *Nucleic Acids Res*. 2011 Aug; 39 (14): e91. DOI: 10.1093/nar/gkr225.
158. Namiki T, Hachiya T, Tanaka H, Sakakibara Y. MetaVelvet: an extension of Velvet assembler to de novo metagenome assembly from short sequence reads. *Nucleic Acids Res*. 2012 Nov 1; 40 (20): e155. DOI: 10.1093/nar/gks678.
159. Peng Y, Leung HC, Yiu SM, Chin FY. Meta-IDBA: a de Novo assembler for metagenomic data. *Bioinformatics*. 2011 Jul 1; 27 (13): i94–101. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr216.
160. McDaniel LD, Young E, Delaney J, Ruhna F, Ritchie KB, Paul JH. High Frequency of Horizontal Gene Transfer in the Oceans. *Science*. 2010 Oct 1; 330 (6000): 50. DOI: 10.1126/science.1192243.
161. Jazaeri Farsani SM, Oude Munnink BB, Deijs M, Canuti M, van der Hoek L. Metagenomics in virus discovery. *ISBT Science Series*. 2013; 8: 193–4.
162. Pyrc K, Berkhout B, van der Hoek L. Identification of new human coronaviruses. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2007 Apr; 5 (2): 245–53. DOI: 10.1586/14787210.5.2.245.
163. Jazaeri Farsani SM, Oude Munnink BB, Canuti M, Deijs M, Cotten M, Jebbink MF, et al. Identification of a novel human rhinovirus C type by antibody capture VIDISCA-454. *Viruses*. 2015 Jan 19; 7 (1): 239–51. DOI: 10.3390/v7010239.

## References

1. Lee N, Hui D, Wu A, Chan P, Cameron P, Joynt GM, et al. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med*. 2003 May 15; 348 (20): 1986–94. DOI: 10.1056/NEJMoa030685.
2. Poutanen SM, Low DE, Henry B, Finkelshein S, Rose D, Green K, et al. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. *N Engl J Med*. 2003 May 15; 348 (20): 1995–2005. DOI: 10.1056/NEJMoa030634.
3. Tsang KW, Ho PL, Ooi GC, Yee WK, Wang T, Chan-Yeung M, et al. A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med*. 2003 May 15; 348 (20): 1977–85. DOI: 10.1056/NEJMoa030666.
4. Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*. 2003 May 15; 348 (20): 1967–76. DOI: 10.1056/NEJMoa030747.
5. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*. 2003 May 15; 348 (20): 1953–66. DOI: 10.1056/NEJMoa030781.
6. Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LY, Lim W, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*. 2003 Apr 19; 361 (9366): 1319–25. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)13077-2.
7. Surjit M, Kumar R, Mishra RN, Reddy MK, Chow VT, Lal SK. The severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein is phosphorylated and localizes in the cytoplasm by 14-3-3-mediated translocation. *J Virol*. 2005 Sep; 79 (17): 11476–86. DOI: 10.1128/JVI.79.17.11476-11486.2005.
8. Marra MA, Jones SJ, Astell CR, Holt RA, Brooks-Wilson A, Butterfield YS, et al. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science*. 2003 May 30; 300 (5624): 1399–404. DOI: 10.1126/science.1085953.
9. Song HD, Tu CC, Zhang GW, Wang SY, Zheng K, Lei LC, et al. Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb 15; 102 (7): 2430–5. DOI: 10.1073/pnas.0409608102.
10. Zhao GP. SARS molecular epidemiology: A Chinese fairy tale of controlling an emerging zoonotic disease in the genomics era. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2007 Jun 29; 362 (1482): 1063–81. DOI: 10.1098/rstb.2007.2034.
11. Cleri DJ, Ricketti AJ, Vernaleo JR. Severe acute respiratory syndrome (SARS). *Infect Dis Clin North Am*. 2010 Mar; 24 (1): 175–202. DOI: 10.1016/j.idc.2009.10.005.
12. Cheng VC, Chan JF, To KK, Yuen KY. Clinical management and infection control of SARS: lessons learned. *Antiviral Res*. 2013 Nov; 100 (2): 407–19. DOI: 10.1016/j.antiviral.2013.08.016.
13. Pyrc K, Berkhout B, van der Hoek L. The novel human coronaviruses NL63 and HKU1. *J Virol*. 2007 Apr; 81 (7): 3051–7. DOI: 10.1128/JVI.01466-06.
14. Lau SK, Li KS, Huang Y, Shek CT, Tse H, Wang M, et al. Ecoepidemiology and complete genome comparison of different strains of severe acute respiratory syndrome-related Rhinophus bat coronavirus in China reveal bats as a reservoir for acute, self-limiting infection that allows recombination events. *J Virol*. 2010 Mar; 84 (6): 2808–19. DOI: 10.1128/JVI.02219-09.
15. van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, et al. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med*. 2004 Apr; 10 (4): 368–73. DOI: 10.1038/nm1024.
16. Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, Wong BH, et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol*. 2005 Jan; 79 (2): 884–95. DOI: 10.1128/JVI.79.2.884-895.2005.
17. Goes LG, Durigon EL, Campos AA, Hein N, Passos SD, Jerez JA. Coronavirus HKU1 in children, Brazil, 1995. *Emerg Infect Dis*. 2011 Jun; 17 (6): 1147–8. DOI: 10.3201/eid1706.101381.
18. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med*. 2012 Nov 8; 367 (19): 1814–20. DOI: 10.1056/NEJMoa1211721.
19. de Groot RJ, Baker SC, Baric RS, Brown CS, Drosten C, Enjuanes L, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): Announcement of the Coronavirus Study Group. *J Virol*. 2013 Jul; 87 (14): 7790–2. DOI: 10.1128/JVI.01244-13.
20. World Health Organisation Global Alert and Response (GAR), MERS-CoV summary updates. Available from: [http://www.who.int/csr/disease/coronavirus\\_infections/archive\\_updates/en/](http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/archive_updates/en/).
21. Assiri A, McGeer A, Perl TM, Price CS, Al Rabeeah AA, Cummings DA, et al. Hospital outbreak of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *N Engl J Med*. 2013 Aug 1; 369 (5): 407–16. DOI: 10.1056/NEJMoa1306742.
22. Assiri A, Al-Tawfiq JA, Al-Rabeeah AA, Al-Rabiah FA, Al-Hajjar S, Al-Barrak A, et al. Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease from Saudi Arabia: A descriptive study. *Lancet Infect Dis*. 2013 Sep; 13 (9): 752–61. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70204-4.
23. Mailles A, Blanckaert K, Chaud P, van der Werf S, Lina B, Caro V, et al. First cases of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) infections in France, investigations and implications for the prevention of human-to-human transmission, France, May 2013. *Euro Surveill*. 2013 Jun 13; 18 (24): pii: 20502.
24. de Sousa R, Reusken C, Koopmans M. MERS coronavirus: Data gaps for laboratory preparedness. *J Clin Virol*. 2014 Jan; 59 (1): 4–11. DOI: 10.1016/j.jcv.2013.10.030.
25. Breban R, Riou J, Fontanet A. Interhuman transmissibility of Middle East respiratory syndrome coronavirus: estimation of pandemic risk. *Lancet*. 2013 Aug 24; 382 (9893): 694–9. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61492-0.
26. Coleman CM, Frieman MB. Coronaviruses: Important Emerging Human Pathogens. *J Virol*. 2014 May; 88 (10): 5209–12. DOI: 10.1128/JVI.03488-13.

27. Hui DS, Zumla A. Advancing priority research on the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J Infect Dis.* 2014 Jan 15; 209 (2): 173–6. DOI: 10.1093/infdis/jit591.
28. Memish ZA, Zumla AI, Al-Hakeem RF, Al-Rabeeh AA, Stephens GM. Family cluster of Middle East respiratory syndrome coronavirus infections. *N Engl J Med.* 2013 Jun 27; 368 (26): 2487–94. DOI: 10.1056/NEJMoa1303729.
29. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med.* 2001 Jun; 7 (6): 719–24. DOI: 10.1038/89098.
30. de Graaf M, Osterhaus AD, Fouchier RA, Holmes EC. Evolutionary dynamics of human and avian metapneumoviruses. *J Gen Virol.* 2008 Dec; 89 (Pt 12): 2933–42. DOI: 10.1099/vir.0.2008/006957-0.
31. Yang CF, Wang CK, Tollefson SJ, Piyaratna R, Lintao LD, Chu M, et al. Genetic diversity and evolution of human metapneumovirus fusion protein over twenty years. *Virol J.* 2009 Sep 9; 6: 138. DOI: 10.1186/1743-422X-6-138.
32. Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, Halburnt-Rush LL, Pingsterhaus JM, Edwards KM, et al. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med.* 2004 Jan 29; 350 (5): 443–50. DOI: 10.1056/NEJMoa025472.
33. Esper F, Martinello RA, Boucher D, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, et al. A 1-year experience with human metapneumovirus in children aged <5 years. *J Infect Dis.* 2004 Apr 15; 189 (8): 1388–96. DOI: 10.1086/382482.
34. Edwards KM, Zhu Y, Griffin MR, Weinberg GA, Hall CB, Szilagyi PG, et al. New Vaccine Surveillance, N. Burden of human metapneumovirus infection in young children. *N Engl J Med.* 2013 Feb 14; 368 (7): 633–43. DOI: 10.1056/NEJMoa1204630.
35. Semple MG, Cowell A, Dove W, Greensill J, McNamara PS, Halfhide C, et al. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. *J Infect Dis.* 2005 Feb 1; 191 (3): 382–6. DOI: 10.1086/426457.
36. van den Hoogen BG, van Doornum GJ, Fockens JC, Cornelissen JJ, Beyer WE, de Groot R, et al. Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients. *J Infect Dis.* 2003 Nov 15; 188 (10): 1571–7. DOI: 10.1086/379200.
37. Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, Givney RC, Ratcliff RM. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS Pathog.* 2009 Apr; 5 (4): e1000391. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000391.
38. Kapoor A, Slikas E, Simmonds P, Chieochansin T, Naeem A, Shaikat S, et al. A newly identified bocavirus species in human stool. *J Infect Dis.* 2009 Jan 15; 199 (2): 196–200. DOI: 10.1086/595831.
39. Kapoor A, Simmonds P, Slikas E, Li L, Bodhidatta L, Sethabutr O, et al. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *J Infect Dis.* 2010 Jun 1; 201 (11): 1633–43. DOI: 10.1086/652416.
40. von Linstow ML, Høgh M, Høgh B. Clinical and epidemiologic characteristics of human bocavirus in Danish infants: Results from a prospective birth cohort study. *Pediatr Infect Dis J.* 2008 Oct; 27 (10): 897–902. DOI: 10.1097/INF.0b013e3181757b16.
41. Jartti T, Hedman K, Jartti L, Ruuskanen O, Allander T, Soderlund-Venermo M. Human bocavirus — the first 5 years. *Rev Med Virol.* 2012 Jan; 22 (1): 46–64. DOI: 10.1002/rmv.720.
42. Vicente D, Cilla G, Montes M, Pérez-Yarza EG, Pérez-Trallero E. Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerg Infect Dis.* 2007 Apr; 13 (4): 636–7. DOI: 10.3201/eid1304.061501.
43. Huang Q, Deng X, Yan Z, Cheng F, Luo Y, Shen W, et al. Establishment of a reverse genetics system for studying human bocavirus in human airway epithelia. *PLoS Pathog.* 2012; 8 (8): e1002899. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002899.
44. Deng X, Li Y, Qiu J. Human bocavirus 1 infects commercially available primary human airway epithelium cultures productively. *J Virol Methods.* 2014 Jan; 195: 112–9. DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.10.012.
45. Dijkman R, Koekkoek SM, Molenkamp R, Schildgen O, van der Hoek L. Human bocavirus can be cultured in differentiated human airway epithelial cells. *J Virol.* 2009 Aug; 83 (15): 7739–48. DOI: 10.1128/JVI.00614-09.
46. Chow BD, Ou Z, Esper FP. Newly recognized bocaviruses (HBoV, HBoV2) in children and adults with gastrointestinal illness in the United States. *J Clin Virol.* 2010 Feb; 47 (2): 143–7. DOI: 10.1016/j.jcv.2009.11.030.
47. Han TH, Kim CH, Park SH, Kim EJ, Chung JY, Hwang ES. Detection of human bocavirus-2 in children with acute gastroenteritis in South Korea. *Arch Virol.* 2009; 154 (12): 1923–7. DOI: 10.1007/s00705-009-0533-3.
48. Santos N, Peret TC, Humphrey CD, Albuquerque MC, Silva RC, Benati FJ, et al. Human bocavirus species 2 and 3 in Brazil. *J Clin Virol.* 2010 Jun; 48 (2): 127–30. DOI: 10.1016/j.jcv.2010.03.014.
49. Song JR, Jin Y, Xie ZP, Gao HC, Xiao NG, Chen WX, et al. Novel human bocavirus in children with acute respiratory tract infection. *Emerg Infect Dis.* 2010 Feb; 16 (2): 324–7. DOI: 10.3201/eid1602.090553.
50. Han TH, Chung JY, Hwang ES. Human bocavirus 2 in children, South Korea. *Emerg Infect Dis.* 2009 Oct; 15 (10): 1698–700. DOI: 10.3201/eid1510.090337.
51. Regamey N, Frey U, Deffenez C, Latzin P, Kaiser L; Swiss Paediatric Respiratory Research Group. Isolation of human bocavirus from Swiss infants with respiratory infections. *Pediatr Infect Dis J.* 2007 Feb; 26 (2): 177–9. DOI: 10.1097/01.inf.0000250623.43107.bc.
52. Schildgen O, Möller A, Allander T, Mackay IM, Völz S, Kupfer B, et al. Human bocavirus: passenger or pathogen in acute respiratory tract infections? *Clin Microbiol Rev.* 2008 Apr; 21 (2): 291–304. DOI: 10.1128/CMR.00030-07.
53. Bastien N, Brandt K, Dust K, Ward D, Li Y. Human bocavirus infection, Canada. *Emerg Infect Dis.* 2006 May; 12 (5): 848–50. DOI: 10.3201/eid1205.051424.
54. Kupfer B, Vehreschild J, Cornely O, Kaiser R, Plum G, Viazov S, et al. Severe pneumonia and human bocavirus in adult. *Emerg Infect Dis.* 2006 Oct; 12 (10): 1614–6. DOI: 10.3201/eid1210.060520.
55. Allander T. Human bocavirus. *J Clin Virol.* 2008 Jan; 41 (1): 29–33. DOI: 10.1016/j.jcv.2007.10.026.
56. Manning A, Russell V, Eastick K, Leadbetter GH, Hallam N, Templeton K, et al. Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses. *J Infect Dis.* 2006 Nov 1; 194 (9): 1283–90. DOI: 10.1086/508219.
57. Longtin J, Bastien M, Gilca R, Leblanc E, de Serres G, Bergeron MG, et al. Human bocavirus infections in hospitalized children and adults. *Emerg Infect Dis.* 2008 Feb; 14 (2): 217–21. DOI: 10.3201/eid1402.070851.
58. Fry AM, Lu X, Chittaganpitch M, Peret T, Fischer J, Dowell SF, et al. Human bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand. *J Infect Dis.* 2007 Apr 1; 195 (7): 1038–45. DOI: 10.1086/512163.
59. Arnold JC, Singh KK, Spector SA, Sawyer MH. Human bocavirus: prevalence and clinical spectrum at a children's hospital. *Clin Infect Dis.* 2006 Aug 1; 43 (3): 283–8. DOI: 10.1086/505399.
60. Keskibir D, Vazquez M, Weibel C, Shapiro ED, Ferguson D, Landry ML, et al. Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J Infect Dis.* 2006 Nov 1; 194 (9): 1276–82. DOI: 10.1086/508213.
61. Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia, USA: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007. P. 1691–1740.
62. Ludwig S, Stitz L, Planz O, Van H, Fitch WM, Scholtissek C. European swine virus as a possible source for the next influenza pandemic? *Virology.* 1995 Oct 1; 212 (2): 555–61. DOI: 10.1006/viro.1995.1513.
63. Peiris JS, de Jong MD, Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. *Clin Microbiol Rev.* 2007 Apr; 20 (2): 243–67. DOI: 10.1128/CMR.00037-06.
64. Sharma S, Mayank A, Lal SK. Molecular events leading to the creation of a pandemic influenza virus. *Indian J Microbiol.* 2009

- Dec; 49 (4): 332–8. DOI: 10.1007/s12088-009-0059-0.
65. Ito T, Couceiro JN, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol.* 1998 Sep; 72 (9): 7367–73.
  66. Kasowski EJ, Garten RJ, Bridges CB. Influenza pandemic epidemiologic and virologic diversity: reminding ourselves of the possibilities. *Clin Infect Dis.* 2011 Jan 1; 52 Suppl 1: S44–9. DOI: 10.1093/cid/ciq010.
  67. Brockwell-Staats C, Webster RG, Webby RJ. Diversity of influenza viruses in swine and the emergence of a novel human pandemic influenza A (H1N1). *Influenza Other Respir Viruses.* 2009 Sep; 3 (5): 207–13. DOI: 10.1111/j.1750-2659.2009.00096.
  68. Dawood FS, Iuliano AD, Reed C, Meltzer MI, Shay DK, Cheng PY, et al. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. *Lancet Infect Dis.* 2012 Sep; 12 (9): 687–95. DOI: 10.1016/S1473-3099(12)70121-4.
  69. To KK, Chan JF, Chen H, Li I, Yuen KY. The emergence of influenza A H7N9 in human beings 16 years after influenza A H5N1: a tale of two cities. *Lancet Infect Dis.* 2013 Sep; 13 (9): 809–21. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70167-1.
  70. Chang SY, Lin PH, Tsai JC, Hung CC, Chang SC. The first case of H7N9 influenza in Taiwan. *Lancet.* 2013 May 11; 381 (9878): 1621. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60943-5.
  71. Parry J. H7N9 avian flu infects humans for the first time. *BMJ.* 2013 Apr 4; 346: f2151. DOI: 10.1136/bmj.f2151.
  72. Nicoll A, Danielsson N. A novel reassortant avian influenza A (H7N9) virus in China —what are the implications for Europe. *Euro Surveill.* 2013 Apr 11; 18 (15): 20452.
  73. Hirst M, Astell CR, Griffith M, Coughlin SM, Moksa M, Zeng T, et al. Novel avian influenza H7N3 strain outbreak, British Columbia. *Emerg Infect Dis.* 2004 Dec; 10 (12): 2192–5. DOI: 10.3201/eid1012.040743.
  74. Koopmans M, Wilbrink B, Conyn M, Natrop G, van der Nat H, Vennema H, et al. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet.* 2004 Feb 21; 363 (9409): 587–93. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)15589-X.
  75. Du Ry van Beest Holle M, Meijer A, Koopmans M, de Jager CM. Human-to-human transmission of avian influenza A/H7N7, The Netherlands, 2003. *Euro Surveill.* 2005 Dec; 10 (12): 264–8.
  76. Li Q, Zhou L, Zhou M, Chen Z, Li F, Wu H, et al. Epidemiology of human infections with avian influenza A (H7N9) virus in China. *N Engl J Med.* 2014 Feb 6; 370 (6): 520–32. DOI: 10.1056/NEJMoa1304616.
  77. Jonges M, Meijer A, Fouchier RA, Koch G, Li J, Pan JC, et al. Guiding outbreak management by the use of influenza A(H7Nx) virus sequence analysis. *Euro Surveill.* 2013 Apr 18; 18 (16): 20460.
  78. Muniesa M, Hammerl JA, Hertwig S, Appel B, Brüssow H. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: a new challenge for microbiology. *Appl Environ Microbiol.* 2012 Jun; 78 (12): 4065–73. DOI: 10.1128/AEM.00217-12.
  79. Mariani-Kurkdjian P, Bingen E, Gault G, Jourdan-Da Silva N, Weill FX. *Escherichia coli* O104:H4 south-west France, June 2011. *Lancet Infect Dis.* 2011 Oct; 11 (10): 732–3. DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70266-3.
  80. Werber D, Mason BW, Evans MR, Salmon RL. Preventing household transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 infection: promptly separating siblings might be the key. *Clin Infect Dis.* 2008 Apr 15; 46 (8): 1189–96. DOI: 10.1086/587670.
  81. Aldabe B, Delmas Y, Gault G, Vendrely B, Llanas B, Charron M, et al. Household transmission of haemolytic uraemic syndrome associated with *Escherichia coli* O104:H4, south-western France, June 2011. *Euro Surveill.* 2011 Aug 4; 16 (31). pii: 19934.
  82. Kuijper EJ, Soonawala D, Vermont C, van Dissel JT. Household transmission of haemolytic uraemic syndrome associated with *Escherichia coli* O104:H4 in the Netherlands, May 2011. *Euro Surveill.* 2011 Jun 23; 16 (25). pii: 19897.
  83. Hauri A, Gotsch U, Strotmann I, Krahn J, Bettge-Weller G, Westbrock H, et al. Secondary transmissions during the outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104 in Hesse, Germany, 2011. *Euro Surveill.* 2011 Aug 4; 16 (31). pii: 19937.
  84. Brzuszkiewicz E, Thürmer A, Schuldes J, Leimbach A, Liesegang H, Meyer FD, et al. Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: entero-aggregative-haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Arch Microbiol.* 2011 Dec; 193 (12): 883–91. DOI: 10.1007/s00203-011-0725-6.
  85. Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, Zentz EB, Leopold SR, Rico A, et al. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS One.* 2011; 6 (7): e22751. DOI: 10.1371/journal.pone.0022751.
  86. Rasko DA, Webster DR, Sahl JW, Bashir A, Boisen N, Scheut F, et al. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. *N Engl J Med.* 2011 Aug 25; 365 (8): 709–17. DOI: 10.1056/NEJMoa1106920.
  87. Mossoro C, Glaziou P, Yassibanda S, Lan NT, Bekondi C, Minssart P, et al. Chronic diarrhea, hemorrhagic colitis, and hemolytic-uremic syndrome associated with HEp-2 adherent *Escherichia coli* in adults infected with human immunodeficiency virus in Bangui, Central African Republic. *J Clin Microbiol.* 2002 Aug; 40 (8): 3086–8.
  88. Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, Bauwens A, et al. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis.* 2011 Sep; 11 (9): 671–6. DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70165-7.
  89. Gaynes R, Edwards JR; National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis.* 2005 Sep 15; 41 (6): 848–54.
  90. Neuhauser MM, Weinstein RA, Rydman R, Danziger LH, Karam G, Quinn JP. Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use. *JAMA.* 2003 Feb 19; 289 (7): 885–8.
  91. Lee K, Lee HS, Jang SJ, Park AJ, Lee MH, Song WK, et al. Antimicrobial resistance surveillance of bacteria in 1999 in Korea with a special reference to resistance of enterococci to vancomycin and gram-negative bacilli to third generation cephalosporin, imipenem, and fluoroquinolone. *J Korean Med Sci.* 2001 Jun; 16 (3): 262–70. DOI: 10.3346/jkms.2001.16.3.262.
  92. Dubois V, Arpin C, Melon M, Andre C, Frigo C, et al. Nosocomial outbreak due to a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12: efficacy of cefepime-amikacin therapy and analysis of beta-lactam resistance. *J Clin Microbiol.* 2001 Jun; 39 (6): 2072–8. DOI: 10.1128/JCM.39.6.2072-2078.2001.
  93. Rhomborg PR, Jones RN. Contemporary activity of meropenem and comparator broad-spectrum agents: MYSTIC program report from the United States component (2005). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007 Feb; 57 (2): 207–15. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2006.07.009.
  94. Agodi A, Zarrilli R, Barchitta M, Anzaldi A, Di Popolo A, Mattaliano A, et al. Alert surveillance of intensive care unit-acquired *Acinetobacter* infections in a Sicilian hospital. *Clin Microbiol Infect.* 2006 Mar; 12 (3): 241–7. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2005.01339.x.
  95. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin Infect Dis.* 2001 May 15; 32 Suppl 2: S94–103. DOI: 10.1086/320182.
  96. Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, Mohapatra S, Casellas JM, Goossens H, et al. Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of production of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Infect Dis.* 2004 Jun 1; 39 (1): 31–7. DOI: 10.1086/420816.
  97. Wright GD, Poinar H. Antibiotic resistance is ancient: implications for drug discovery. *Trends Microbiol.* 2012 Apr; 20 (4): 157–9. DOI: 10.106/j.tim.2012.01.002.
  98. D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, et al. Antibiotic resistance is ancient. *Nature.* 2011 Aug 31; 477 (7365): 457–61. DOI: 10.1038/nature10388.



99. Wybenga-Groot LE, Draker K, Wright GD, Berghuis AM. Crystal structure of an aminoglycoside 60-N-acetyltransferase: defining the GCN5-related N-acetyltransferase superfamily fold. *Structure*. 1999 May; 7 (5): 497–507.
100. Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, et al. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One*. 2012; 7 (4): e34953. DOI: 10.1371/journal.pone.0034953.
101. Hon WC, McKay GA, Thompson PR, Sweet RM, Yang DS, Wright GD, et al. Structure of an enzyme required for aminoglycoside antibiotic resistance reveals homology to eukaryotic protein kinases. *Cell*. 1997 Jun 13; 89 (6): 887–95.
102. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat Park CH, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med*. 2006 Jan; 12 (1): 83–8. DOI: 10.1038/nm1347.
103. Barlow M, Hall BG. Origin and evolution of the AmpC betalactamases of *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 May; 46 (5): 1190–8.
104. Koskiniemi S, Pranting M, Gullberg E, Näsvalld J, Andersson DI. Activation of cryptic aminoglycoside resistance in *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol*. 2011 Jun; 80 (6): 1464–78. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07657.x.
105. Lindsay JA. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*. 2010 Feb; 300 (2–3): 98–103. DOI: 10.1016/j.ijmm.2009.08.013.
106. Moore AM, Munck G, Sommer MO, Dantas G. Functional metagenomic investigations of the human intestinal microbiota. *Front Microbiol*. 2011 Oct 17; 2: 188. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00188.
107. Moore AM, Patel S, Forsberg KJ, Wang B, Bentley G, Razia Y, et al. Pediatric fecal microbiota harbor diverse and novel antibiotic resistance genes. *PLoS One*. 2013 Nov 13; 8 (11): e78822. DOI: 10.1371/journal.pone.0078822.
108. Taur Y, Xavier JB, Lipuma L, Ubeda C, Goldberg J, Gobourne A, et al. Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis*. 2012 Oct; 55 (7): 905–14. DOI: 10.1093/cid/cis580.
109. Smillie CS, Smith MB, Friedman J, Cordero OX, David LA, Alm EJ. Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome. *Nature*. 2011 Oct; 480 (7376): 241–4. DOI: 10.1038/nature10571.
110. Jiang HX, Tang D, Liu YH, Zhang XH, Zeng ZL, Xu L, et al. Prevalence and characteristics of beta-lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from farmed fish in China. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67 (10): 2350–3. DOI: 10.1093/jac/dks250.
111. Holvoet K, Sompers I, Callens B, Dewulf J, Uyttendaele M. Moderate prevalence of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from lettuce, irrigation water, and soil. *Appl Environ Microbiol*. 2013 Nov; 79 (21): 6677–83. DOI: 10.1128/AEM.01995-13.
112. McNeece G, Naughton V, Woodward MJ, Dooley JS, Naughton PJ. Array based detection of antibiotic resistance genes in Gram-negative bacteria isolated from retail poultry meat in the UK and Ireland. *Int J Food Microbiol*. 2014 Jun 2; 179: 24–32. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.019.
113. Diarra MS, Delaquis P, Rempel H, Bach S, Harlton C, Aslam M, et al. Antibiotic resistance and diversity of *Salmonella enteric* serovars associated with broiler chickens. *J Food Prot*. 2014 Jan; 77 (1): 40–9. DOI: 10.4315/0362-028.JFP-13-251.
114. Zhu YG, Johnson TA, Su JQ, Qiao M, Guo GX, Stedtfeld RD, et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Feb 26; 110 (9): 3435–40. DOI: 10.1073/pnas.1222743110.
115. Lim DV, Simpson JM, Kearns EA, Kramer MF. Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare. *Clin Microbiol Rev*. 2005 Oct; 18 (4): 583–607. DOI: 10.1128/CMR.18.4.583-607.2005.
116. Bell CA, Uhl JR, Hadfield TL, David JC, Meyer RF, Smith TF, et al. Detection of *Bacillus anthracis* DNA by LightCycler PCR. *J Clin Microbiol*. 2002 Aug; 40 (8): 2897–902.
117. Fode-Vaughan KA, Maki JS, Benson JA, Collins ML. Direct PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol*. 2003; 37 (3): 239–43.
118. Ibekwe AM, Grieve CM. Detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in environmental samples by real-time PCR. *J Appl Microbiol*. 2003; 94 (3): 421–31.
119. Garcia ME, Blanco JL, Caballero J, Gargallo-Viola D. Anticoagulants interfere with PCR used to diagnose invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2002 Apr; 40 (4): 1567–8.
120. Morata P, Queipo-Ortuno MI, de Dios Colmenero J. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol*. 1998 Sep; 36 (9): 2443–6.
121. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome Sequencing in Open Microfabricated High-Density Picoliter Reactors. *Nature*. 2005 Sep 15; 437 (7057): 376–80. DOI: 10.1038/nature03959.
122. Droege M, Hill B. The Genome Sequencer FLX System—longer reads, more applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets. *J Biotechnol*. 2008 Aug 31; 136 (1–2): 3–10. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2008.03.021.
123. Roche Shutting Down 454 Sequencing Business [Internet]. Genome Web LLC. c2016 — [cited 2017 Feb]. Available from: <https://www.genomeweb.com/sequencing/roche-shutting-down-454-sequencing-business>.
124. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 2011 Jul 2; 475 (7356): 348–52. DOI: 10.1038/nature10242.
125. New Ion S5 and Ion S5 XL NGS Systems for Targeted Sequencing [Internet]. Available from: <http://www.thermofisher.com/ru/ru/home/products-and-services/promotions/ion-s5-ngs.html?CID=fl-ions5>.
126. Heger M. Thermo Fisher Launches New Systems to Focus on Plug and Play Targeted Sequencing. Genome Web LLC [Internet]. 2015 Sep 01 [cited 2017 Feb]. Available from: <https://www.genomeweb.com/sequencing-technology/thermo-fisher-launches-new-systems-focus-plug-and-play-targeted-sequencing>.
127. Shaikh-Lesko R. Sequencing on the Seven Seas. The Scientist [Internet]. 2014 Aug 01 [cited 2017 Feb]. Available from: <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/40556/title/Sequencing-on-the-Seven-Seas/>.
128. Ma Z, Lee RW, Li B, Kenney P, Wang Y, Erikson J, et al. Isothermal amplification method for next-generation sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Aug 27; 110 (35): 14320–3. DOI: 10.1073/pnas.1311334110.
129. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*. 2008 Nov 6; 456 (7218): 53–9. DOI: 10.1038/nature07517.
130. Luo C, Tsementzi D, Kyrpides N, Read T, Kostantinidis KT. Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample. *PLoS One*. 2012; 7 (2): e30087. DOI: 10.1371/journal.pone.0030087.
131. Nakamura K, Oshima T, Morimoto T, Ikeda S, Yoshikawa H, Shiwa Y, et al. Sequence-specific error profile of Illumina sequencers. *Nucleic Acids Res*. 2011 Jul; 39 (13): e90. DOI: 10.1093/nar/gkr344.
132. Dohm JC, Lottaz C, Borodina T, Himmelbauer H. Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing. *Nucleic Acids Res*. 2008; 36 (16): e105. DOI: 10.1093/nar/gkn425.
133. Kebschull JM, Zador AM. Sources of PCR-induced distortions in high-throughput sequencing data sets. *Nucleic Acids Res*. 2015 Dec 2; 43 (21): e143. DOI: 10.1093/nar/gkv717.
134. Aird D, Ross MG, Chen WS, Danielsson M, Fennel T, Russ C, et al. Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. *Genome Biol*. 2011; 12 (2): R18. DOI: 10.1186/gb-2011-12-2-r18.
135. Thompson JF, Milos PM. The properties and applications of single-molecule DNA sequencing. *Genome Biol*. 2011; 12 (2): 217. DOI: 10.1186/gb-2011-2-217.



136. Ozsolak F, Platt AR, Jones DR, Reifenger JG, Sass LE, McInerney P, et al. Direct RNA sequencing. *Nature*. 2009 Oct 8; 461 (7265): 814–8. DOI: 10.1038/nature08390.
137. Battered Helicos BioSciences Corporation (HLCS) Files for Chapter 11. BioSpace [Internet]. 2012 Nov 16 [cited 2017 Feb]. Available from: <http://www.biospace.com/News/battered-helicos-biosciences-corporation-files-for-280101>.
138. Eid J, Fehr A, Gray J, Luong K, Lyle J, Otto G, et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science*. 2009 Jan 2; 323 (5910): 133–8. DOI: 10.1126/science.1162986.
139. Flusberg BA, Webster DR, Lee JH, Travers KJ, Olivares EC, Clark TA, et al. Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. *Nat Methods*. 2010 Jun; 7 (6): 461–5. DOI: 10.1038/nmeth.1459.
140. Travers KJ, Chin CS, Rank DR, Eid JS, Turner SW. A flexible and efficient template format for circular consensus sequencing and SNP detection. *Nucleic Acids Res*. 2010 Aug; 38 (15): e159. DOI: 10.1093/nar/gkq543.
141. Pacific Biosciences Launches New Sequencing Platform Based on Its SMRT Technology. Pacific Biosciences [Internet]. 2015 Sep 30 [cited 2017 Feb]. Available from: <http://investor.pacificbiosciences.com/releasedetail.cfm?releaseid=934581>.
142. Kasianowicz JJ, Brandin E, Branton D, Deamer DW. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 26; 93 (24): 13770–3.
143. Check Hayden E. Pint-sized DNA sequencer impresses first users. *Nature*. 2015 May 7; 521 (7550): 15–6. DOI: 10.1038/521015a.
144. Mikheyev AS, Tin MM. A first look at the Oxford Nanopore MinION sequencer. *Mol Ecol Resour*. 2014 Nov; 14 (6): 1097–102.
145. Greninger AL, Naccache SN, Federman S, Yu G, Mbala P, Bres V, et al. Rapid metagenomic identification of viral pathogens in clinical samples by real-time nanopore sequencing analysis. *Genome Med*. 2015 Sep 29; 7: 99. DOI: 10.1186/s13073-015-220-9.
146. Cao MD, Ganesamoorthy D, Elliott AG, Zhang H, Cooper MA, Coin LJ, et al. Real-time strain typing and analysis of antibiotic resistance potential using Nanopore MinION sequencing. 2016 Jul 26; 5 (1): 32. DOI: 10.1186/s13742-016-0137-2.
147. *Solanum pennellii* (new cultivar) — PlabiPD [Internet]. Aachen, Germany: IBG-2 Forschungszentrum Jülich, Institute of Biology-1 RWTH. c2014–2017 [cited 2017 Feb]. Available from: <http://www.plabipd.de/portal/solanum-pennellii>.
148. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, et al. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Jul; 72 (7): 5069–72. DOI: 10.1128/AEM.03006-05.
149. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics*. 2009 Jul 15; 25 (14): 1754–60. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp324.
150. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol*. 2009; 10 (3): R25. DOI: 10.1186/gb-2009-10-3-r25.
151. Liu B, Gibbons T, Ghodsi M, Ghodsi M, Treangen T, Pop M. Accurate and fast estimation of taxonomic profiles from metagenomic shotgun sequences. *BMC Genomics*. 2011; 12 Suppl 2: S4. DOI: 10.1186/1471-2164-12-S2-S4.
152. Segata N, Waldron L, Ballarín A, Narasimhan V, Jousson O, Huttenhower C. Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes. *Nat Methods*. 2012 Jun 10; 9 (8): 811–4. DOI: 10.1038/nmeth.2066.
153. Wu M, Eisen JA. A simple, fast, and accurate method of phylogenomic inference. *Genome Biol*. 2008 Oct 13; 9 (10): R151. DOI: 10.1186/gb-2008-9-10-r151.
154. Shapton TJ, Riesenfeld SJ, Kembel SW, Ladau J, O'Dwyer JP, Green JL, et al. PhylOTU: a high-throughput procedure quantifies microbial community diversity and resolves novel taxa from metagenomic data. *PLoS Comput Biol*. 2011 Jan 20; 7 (1): e1001061. DOI: 10.1371/journal.pcbi.10001061.
155. Huson DH, Mitra S, Ruscheweyh H, Weber N, Schuster SC. Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4. *Genome Res*. 2011 Sep; 21 (9): 1552–60. DOI: 10.1101/gr.120618.111.
156. Meyer F, Paarmann D, D'Souza M, Olson R, Glass EM, Kubal M, et al. The metagenomics RAST server — a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics*. 2008 Sep 19; 9: 386. DOI: 10.1186/1471-2105-9-386.
157. Gerlach W, Stoye J. Taxonomic classification of metagenomic shotgun sequences with CARMA3. *Nucleic Acids Res*. 2011 Aug; 39 (14): e91. DOI: 10.1093/nar/gkr225.
158. Namiki T, Hachiya T, Tanaka H, Sakakibara Y. MetaVelvet: an extension of Velvet assembler to de novo metagenome assembly from short sequence reads. *Nucleic Acids Res*. 2012 Nov 1; 40 (20): e155. DOI: 10.1093/nar/gks678.
159. Peng Y, Leung HC, Yiu SM, Chin FY. Meta-IDBA: a de Novo assembler for metagenomic data. *Bioinformatics*. 2011 Jul 1; 27 (13): i94–101. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr216.
160. McDaniel LD, Young E, Delaney J, Ruhnau F, Ritchie KB, Paul JH. High Frequency of Horizontal Gene Transfer in the Oceans. *Science*. 2010 Oct 1; 330 (6000): 50. DOI: 10.1126/science.1192243.
161. Jazaeri Farsani SM, Oude Munnink BB, Deijs M, Canuti M, van der Hoek L. Metagenomics in virus discovery. *ISBT Science Series*. 2013; 8: 193–4.
162. Pyrc K, Berkhout B, van der Hoek L. Identification of new human coronaviruses. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2007 Apr; 5 (2): 245–53. DOI: 10.1586/14787210.5.2.245.
163. Jazaeri Farsani SM, Oude Munnink BB, Canuti M, Deijs M, Cotten M, Jebbink MF, et al. Identification of a novel human rhinovirus C type by antibody capture VIDISCA-454. *Viruses*. 2015 Jan 19; 7 (1): 239–51. DOI: 10.3390/v7010239.