

Генетическое разнообразие вируса SARS-CoV-2: Орловская область, декабрь, 2020 г.

¹Водопьянов А.С., ¹Писанов Р.В., ¹Подойницына О.А., ¹Кузнецова Д.А., ¹Водопьянов С.О.,
¹Чемисова О.С., ²Румянцев А.П., ³Полякова Е.В., ²Фролова И.Н., ³Махова Т.В., ¹Носков А.К.

¹ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, 344002,
Ростов-на-Дону, Россия;

²Управление Роспотребнадзора по Орловской области

³ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Орловской области» Роспотребнадзора

Аннотация.

Распространение новой коронавирусной инфекции в субъектах Российской Федерации обусловлено последовательным вовлечением в эпидемический процесс различных групп восприимчивого местного населения с отличающимся иммунным статусом и, как следствие, сопровождается генетической изменчивостью вируса SARS-CoV-2, что в свою очередь может привести к формированию новых штаммов возбудителя. Стабилизация уровня заболеваемости населения и наметившаяся тенденция к ее снижению на фоне масштабных противоэпидемических (профилактических) мероприятий, в т.ч. прививочной кампании свидетельствует о необходимости изучения генетической вариабельности S-белка вируса SARS-CoV-2 являющегося основным компонентом вакцин в отдельно взятом субъекте Российской Федерации. В связи с этим, цель работы состояла в сравнительном анализе геномного разнообразия и полиморфизмов S-белка возбудителя COVID-19 циркулирующего на территории Орловской области.

Исследовано 100 образцов биологического материала от больных COVID-19 зарегистрированных в Орловской области. Секвенирование проводили на приборе MiSeq (Illumina, США), сборка геномов осуществлялась путем выравнивания на референсную последовательность уханьского варианта вируса SARS-CoV-2.

Установлено, что на территории Орловской области циркулируют штаммы возбудителя COVID-19 принадлежащие к ветви «B.1.1». Доминирующим вариантом для Орловской области является вариант B.1.1.130. В 54,1 % случаев в изученных образцах выявлен полиморфизм E484K Spike-белка, с которым ряд исследователей связывают уклонение от иммунного ответа макроорганизма.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, Полногеномное секвенирование, Биоинформатика

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, Next-Generation Sequencing, Bioinformatics

Особенности пандемического распространения новой коронавирусной инфекции являются предметом изучения ученых всего мира. В настоящее время становится очевидным, что одной из причин пандемии являются уникальные генетические свойства вируса SARS-CoV-2, который характеризуется высокой частотой мутаций [1].

Широкое развитие методов полногеномного секвенирования и создание общедоступных баз, содержащих данные о нуклеотидных последовательностях

коронавирусов, позволяю**т** изучать особенности циркуляции отдельных клонов возбудителя на различных административных территориях [2-4].

Линейный геном вируса SARS-CoV-2 содержит 25 генов, кодирующих структурные белки: белок зубца короны S (spike), малый белок оболочки E (envelope), мембранный гликопротеин M (membrane), нуклеокапсидный белок N (nucleocapsid), ряд вспомогательных белков и 16 неструктурных белков, включая РНК-зависимую РНК-полимеразу. Особый интерес представляют поверхностные структуры вируса: гликопротеин шипа, гликопротеин мембраны и белок оболочки [4]. Спайк-гликопротеин коронавируса (Spike-protein, S-белок, белок шипа) способствует проникновению в клетки, используя рецептор ACE2 человека, что обуславливает широкое распространение возбудителя среди людей [5-6]. Важно отметить, что именно S-белок является основным компонентом вакцин, что, в свою очередь, объясняет особый интерес исследователей к изменениям структуры данного поверхностного компонента в ходе эпидемического процесса [2, 4, 7].

В связи с этим, цель работы состояла в сравнительном анализе геномного разнообразия и полиморфизмов S-белка возбудителя новой коронавирусной инфекции, циркулирующего на территории Орловской области.

Материалы и методы

Проведен анализ 100 образцов биологического материала от больных COVID-19, зарегистрированных на территории Орловской области в декабре 2020 года, полученных из ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Орловской области» Роспотребнадзора, наличие вируса SARS-CoV-2 в которых было подтверждено с использованием набора реагентов «АмплиСенс® Cov-Bat-FL». Выделение РНК проводили с использованием набора реагентов «АмплиСенс® РИБО-преп». Получение кДНК проводили с использованием набора «АмплиСенс® Реверта», для наработки специфических ампликонов применяли праймеры, предложенные консорциумом ARTIC ([JoshQuick 2020](#)). Синтез праймеров проводили в ООО «НПФ Синтол» (г. Москва).

Полимеразную цепную реакцию проводили в объеме 25мкл в полипропиленовых микроцентрифужных пробирках на программируемом многоканальном термоциклере «Терцик» (ДНК-технология, г. Москва). Инкубационная смесь для ПЦР содержала 20 мМ трис-HCl, pH 8,6; 7 мМ MgCl₂, 10 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,5 мМ ЭДТА, 100 мкг/мл БСА, по 250 мкМ каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов, 15нМ соответствующего праймера, 2 ед. Taq-полимеразы. Детекцию ампликонов проводили в 1% агарозном геле длиной 10 см при напряжении 220В.

Секвенирование проводили на приборе MiSeq (Illumina, США). Сборку геномов проводили путем выравнивания на референсную последовательность штамма hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019(GenBankAccessionNumber MN908947.3). Сборку геномов проводили с использованием программ Minimap2 [8], Samtools [9] и iVar [10]. Геномы депонированы в Российскую платформу агрегации информации о геномах вирусов (проект VGARus, [https:// genome.crie.ru](https://genome.crie.ru)).

Определение генетических линий проводили с использованием программы Pangolin (<https://github.com/cov-lineages/pangolin>).

Сравнительный анализ проведен с использованием данных полногеномного секвенирования, полученных из базы данных GISAID [11]. Для разработки собственного программного обеспечения использовали язык программирования Java.

Результаты и обсуждение

Протокол амплификации, предложенный консорциумом ARTIC, основан на фрагментарной амплификации генома вируса SARS-CoV-2 с использованием 98 пар праймеров, объединенных в два пула. Однако по сообщениям ряда авторов [12, 13] одной из проблем при этом является формирование праймер-димеров, снижающих эффективность амплификации. В связи с этим нами предложено увеличить число пулов, разделив каждый из них еще на две равные группы. В результате визуальная оценка результатов электрофореза показала более выраженные целевые полосы (около 400 п.о.) и меньшую выраженность праймеров-димеров (менее 100 п.о.) при использовании 4 пулов по сравнению с 2 пулами праймеров.

По итогам амплификации с последующим секвенированием удалось получить 96 геномов вируса, из них 84 (87.5 %) – с покрытием более 70%. При этом для 21 образца (21,9 %) получено полное (100 %) покрытие, в среднем покрытие по общей коллекции составило 91%. Для оценки воспроизводимости результатов секвенирование четырех образцов проведено дважды.

По итогам анализа геномов с использованием программы Pangolin установлено, что 100 % установленных геномов относятся к ветви «B.1.1», при этом большинство 49 из них (49 %) относятся к линии «B.1.1.130» (таблица 1). «Британский» (линия B.1.1.7) и «Южноафриканский» (линия B.1.351) варианты коронавируса в исследованных пробах не выявлены.

Таблица 1 – Распределение геномов SARS-CoV-2 по генетическим линиям

Генетическая линия	Количество образцов (абс.)	Доля (%)	Страны, где зарегистрированы генетические линии (по данным базы gisaid.org)
B.1.1.130	49	49%	США, Швейцария, Нидерланды, Дания, Польша, Египет, Индия, Колумбия, Япония, Великобритания и др.
B.1.1	20	20%	Турция, Латвия, Испания, Франция, Ирландия, Швейцария, Израиль, Индия, Дания, Бельгия, Эквадор
B.1.1.51	2	2%	Великобритания, США, Израиль, Нидерланды
B.1.1.141	2	2%	Китай, Япония, Германия, Новая Зеландия
B.1.1.163	2	2%	Австралия, США, Великобритания, Дания, Япония
B.1.1.274	2	2%	США, Дания, Великобритания, Израиль,

			Мексика
B.1.1.245	1	1%	Великобритания, Иран
B.1.1.10	1	1%	Великобритания, США, Азербайджан, Австралия, Бангладеш, Сингапур, Аргентина, Нигерия
B.1.1.288	1	1%	Турция, США, Польша, Дания, Швейцария, Нидерланды, Германия
B.1.1.33	1	1%	Сингапур, США, Испания, Великобритания, Бразилия, Аргентина, Кения
B.1.1.220	1	1%	США, Великобритания, Австралия
B.1.1.171	1	1%	Польша, Китай, Великобритания, Дания, Австралия
B.1.1.152	1	1%	Великобритания, Финляндия
не определена	16	16%	
Итого	100	100 %	

Сравнительный анализ результатов секвенсирования штаммов SARS-CoV-2 полученных в ходе исследования биологического материала от больных, зарегистрированных в Орловской области, проведенный с использованием геномов 14 вирусов, изолированных в соседних с ней регионах (база данных GISAID) свидетельствует о различии доминирующих генетических линий на сопредельных административных территориях РФ (таблица 2). Так, доминирующей в Брянской, Калужской, Тульской и Липецкой областях оказалась линия B.1.1, которая в Орловской области была на втором месте по частоте выделения (20 %).

Таблица 2 – Анализ геномов, полученных из базы данных gisaid.org

Субъект РФ	Количество геномов	Дата выделения	Генетическая линия
Орловская область	2	сентябрь-октябрь, 2020	B.1.1, B.1
Брянская область	3	июнь-октябрь, 2020	B.1.1
Калужская область	4	сентябрь-октябрь, 2020	B.1
Тульская область	3	октябрь, 2020	B.1.1, B.1.1.277
Липецкая область	2	март, 2020	B.1.1
Итого	14		

Для оценки воспроизводимости полученных результатов секвенирование четырех проб было проведено дважды (таблица 3). В одном случае это позволило получить более высокое покрытие и определить генетическую линию (проба № 6), в двух случаях (пробы №№ 25 и 59) результаты определения генетических линий полностью совпали, в одном случае (проба № a29) определены разные генетические линии в пределах одной группы.

Таблица 3 – Оценка воспроизводимости результатов

Номер входящий	Покрытие	Линия
----------------	----------	-------

6	41.2%	не определено
6 - повтор	74.4%	B.1.1.130
25	82.6%	B.1.1.130
25 - повтор	96.7%	B.1.1.130
59	97.8%	B.1.1
59 - повтор	99.3%	B.1.1
a29	99.6%	B.1.1.33
a29 - повтор	99.7%	B.1.1

Не меньший интерес представляет собой анализ нуклеотидных замен, расположенных по всей длине генома, в том числе не приводящих к изменению аминокислотной последовательности.

В настоящее время существует большое количество программных продуктов для идентификации нуклеотидных полиморфизмов в изучаемых геномах и вызываемых ими замен в аминокислотных последовательностях кодируемых генов. Вместе с тем, большинство этих программ построены на использовании визуального интерфейса и ориентированы на работу с одиночным геномом, что делает затруднительным анализ большого числа последовательностей. В связи с этим нами разработано собственное программное обеспечение «SARS-CoV-2 Genome Analyzer», позволяющее проводить пакетный анализ геномов возбудителя новой коронавирусной инфекции. Использование языка программирования Java позволяет использовать программу в операционных системах Microsoft Windows, Linux и MacOS. В основе работы программы лежит выравнивание анализируемой последовательности на референсную последовательность штамма Wuhan-Hu-1 с последующим выявлением нуклеотидных и аминокислотных замен и автоматическим формированием сводной таблицы.

Создание отечественных систем обработки больших объемов данных является одним из приоритетов научно-технологического развития Российской Федерации [14]. Использование разработанной программы открывает широкие возможности по проведению анализа большого количества данных полногеномного секвенирования вируса SARS-CoV-2, полученных другими исследователями и доступных в открытых источниках. Программа доступна для скачивания по адресу <http://antiplague.ru/sars-cov-2-genome-analyzer/>

Для проведения сравнительного анализа из базы данных GISAID были скачаны все доступные геномы возбудителя новой коронавирусной инфекции, выделенные на территории Российской Федерации (1840 геномов). Проведение сравнительного анализа позволило выявить 5 уникальных полиморфизмов, характерных для штаммов вируса SARS-COV-2, выделенных на территории Орловской области. Учитывая, что некоторые геномы вируса могут быть секвенированы не полностью, обнаруженные полиморфизмы были объединены нами в 3 комбинации (группы). При этом пять полиморфизмов из первой группы и два из второй группы обнаружены у 35 штаммов. Полиморфизмы из 3 группы обнаружены у 49 геномов, выделенных в Орловской области (таблица 4). Установлено, что большинство из этой группы штаммов (95,9 %, 47 из 49) принадлежали к генетической линии B.1.1.130.

Следует отметить, что полиморфизмы 12781: С>Т и 18252: С>Т являются синонимичными, то есть не приводящими к изменению аминокислотной последовательности. Полиморфизм 23525: С>Т приводит к замене гистидина на тирозин в 655 позиции Spike-белка (H655Y).

С целью оценки встречаемости обнаруженных нами полиморфизмов был проведен анализ 1840 геномов вируса SARS-COV-2, выделенных на территории России другими авторами, из которых 11 геномов, по данным базы данных GISAID, имели генетическую линию В.1.1.130, совпадающую с большинством штаммов, выделенных в Орловской области. Однако выявленные комбинации полиморфизмов, среди данного набора геномов обнаружены не были. Это позволяет сделать вывод об уникальности данного генетического профиля именно для Орловской области.

Не менее интересным представлялся анализ мировой (глобальной) коллекции геномов, однако это оказалось весьма затруднительным ввиду ее большого объема (на 4 февраля 2021 года в базе GISAID содержались данные более чем о 470 тысячах геномов). В связи с этим были составлены две выборки, содержащие штаммы генетической линии В.1.1.130 (308 геномов) и геномы, содержавшие мутацию H655Y Spike-белка (1522 генома).

По итогам анализа установлено, что полиморфизмы из 1 и 3 группы являются уникальными и не встречаются в этих двух выборках, а из второй группы - были обнаружены в 14 геномах (13 из 14 этих штаммов, выделены на территории Англии в период с мая 2020 г по январь 2021 г, а один штамм – в Ирландии в январе 2021 года). Проведенный анализ с помощью программы Pangolin показал, что 11 из этих штаммов принадлежат к генетической линии В.1.1.7 («британский вариант коронавируса»), но при этом штаммы, выделенные в Орловской области, не имели мутаций N501Y и P681H в Spike-белке, характерных для «британского генотипа». Это позволяет заключить, что для выявления штаммов, характерных для Орловской области, возможно использование только двух групп полиморфизмов, содержащих 5 и 3 SNP, соответственно.

Таблица 4. Отличительные признаки вариантов вируса, выявленных в Орловской области

Группа	Комбинация полиморфизмов	Количество изученных геномов в Орловской области (n=84)	Количество геномов из базы gisaid.org		
			Выделенные в России (n=1840)	Имеющие генетическую линию В.1.1.130 (n=308)	Имеющие полиморфизм H655Y (n=1522)
1	11288: DEL T 12781: C>T 18252: C>T 21994: DEL T 23525: C>T	35	0	0	0
2	21994: DEL T 23525: C>T	35	0	0	14
3	11288: DEL T 12781: C>T	49	0	0	0

Анализ частоты встречаемости остальных единичных нуклеотидных замен показал, что все исследованные геномы содержат мутацию A23403G. Менее частыми мутациями явились C241T и C14408T, выявленные в 90 геномах. Полиморфизмы G28881A, G28882A и G28883C обнаружены у 88 штаммов (данные не представлены). В противовес этому, ряд полиморфизмов выявляются только в единичных геномах. Так было выявлено 64 единичных нуклеотидных замены (SNP), которые были обнаружены у 2 штаммов, и 478 SNP, которые обнаруживались не более, чем в одном из штаммов. Данный факт демонстрирует, что несмотря на высокую частоту мутаций, далеко не каждая из них способна закрепиться в популяции вируса. Одним из объяснений данного феномена может являться отрицательная селекция более вирулентных вариантов вируса [15].

Анализ изменения аминокислотного (АК) состава Spike-белка проведен путем сравнения 1931 нуклеотидной последовательности российских штаммов из базы GISAID включая геномы, полученные в рамках настоящей работы.

В итоге было выявлено 372 типа вариантов АК структуры, из которых 257 были отброшены, так как имелись только у одного штамма, что могло свидетельствовать об ошибках секвенирования. Идентифицированные таким образом 115 типов АК структур Spike-белка SARS-COV-2 содержались в 1674 изолятах, часть из которых была впоследствии идентифицирована среди штаммов из Орловской области (Таблица 5).

Анализ аминокислотных последовательностей Spike-белка (Таблица 5) выявил полиморфизм D614G у всех штаммов, взятых в исследование, что коррелирует с данными, получаемыми другими авторами [2, 15]. Однако, в противовес штаммам SARS-COV-2 циркулирующим в России, для изолятов из Орловской области был характерен выраженный полиморфизм, что проявилось в изменении АК структуры Spike-белка. Так, если для РФ в 58,4 % случаях мутация **D614G** встречалась как единичная замена, то для Орловской области эта величина составила лишь 9,4 %. Более того, четыре комбинации АК мутаций среди штаммов, изолированных в Орловской области, были уникальны (тип 4- Y144del, Y145del, E484K, D614G, H655Y; тип 33- Y144del, Y145del, E484K, D614G; тип 40- L5F, Y144del, Y145del, E484K, D614G, H655Y; тип 52- D614G, Q779K) и суммарно обнаруживались у 34,4 % изолятов (Таблица 5). На наш взгляд подобное расхождение может быть обусловлено тем фактом, что штаммы, выделенные в Орловской области, собраны на пике эпидемии (декабрь 2020 года), а геномы, внесенные в базы GISAID, получены на более ранних этапах эпидемического процесса, когда давление иммунного ответа макроорганизма было не столь велико.

Известно, что полиморфизм **E484K** локализован RBD-домене Spike-белка, обеспечивающего прикрепление вируса к клеткам макроорганизма, и с которым ряд исследователей закономерно связывают уклонение патогена от иммунного ответа [6].

В проведенном исследовании мутация **E484K** Spike-белка обнаружена у 53 из 98 изученных образцов, причем в одном случае этот полиморфизм обнаружен в изоляте с низким покрытием, для которого не удалось установить генетическую линию. Интересно, что данный полиморфизм у штаммов, изолированных в Орловской области, встречался в сочетании с другими заменами, сформировав уникальные типы 4, 33 и 40 упомянутые выше. Интересно отметить высокий удельный вес изолятов с данным типом замен (31,3

%). Возможно, столь активный процесс появления новых антигенных вариантов Spike-белка может быть обусловлен давлением иммунного ответа макроорганизма. Обращает на себя внимание, что эта мутация присуща линии В.1.1.130, доминирующей в Орловской области. Вместе с тем, полиморфизм **E484K** отсутствует среди 14 штаммов, изолированных на территориях сопредельных с Орловской областью субъектов РФ (таблица 2).

В дальнейшем целесообразно изучить взаимосвязь между типом АК замены и клинической картиной. Так, например, замена L54F чаще встречалась у пациентов со средней тяжестью заболевания [4].

Таблица 5 – Сравнительный анализ типов Spike-белка у SARS-COV-2 циркулирующих в Орловской области и России в целом.

Номер фенотипа	АК формула мутантного фенотипа Spike-белка SARS-CoV-2	Доля встречаемости штаммов с данным фенотипом Spike-белка (%)	
		Орловская область	РФ
4	Y144del, Y145del, E484K, D614G, H655Y	21.9%	0.0%
1	D614G	9.4%	58.4%
33	Y144del, Y145del, E484K, D614G	5.2%	0.0%
2	M153T, D614G	4.2%	3.9%
40	L5F, Y144del, Y145del, E484K, D614G, H655Y	4.2%	0.0%
52	D614G, Q779K	3.1%	0.0%
17	E96D, D614G	3.1%	0.3%
13	D614G, Q675R, T859I	2.1%	0.4%
55	E484K, D614G	1.0%	0.1%
3	D138Y, M153T, D614G	1.0%	2.4%
44	D138Y, D614G	1.0%	0.1%
22	D614G, P681R	1.0%	0.3%
18	A222V, D614G	1.0%	0.4%
57	L54F, D614G	1.0%	0.1%

Учитывая, что Spike-белок входит как основной компонент в состав двух зарегистрированных отечественных вакцин и является антигенной мишенью для выявления специфических антител в некоторых ИФА-наборах (Kevin, 2021; РЗН от 11 сентября 2020 № РЗН 2020/10393) столь высокая доля (свыше 50 %) изолятов вируса с мутантным протеином шипа заслуживает пристального внимания. Дальнейшие направления исследований, на наш взгляд, следует направить на поиск других аминокислотных замен в этом важном регионе вируса. Данные исследования позволят ответить на вопрос о возможном появлении «уклоняющихся» вариантов вируса в дальнейшем.

Можно согласиться с мнением, что с течением пандемии происходит постепенное увеличение распространения мутантных вариантов SARS-CoV-2 в популяции. Такая тенденция при ее дальнейшем развитии может потребовать регулярной оптимизации тест-

систем с учётом изменчивости вирусного генома для предотвращения потери контроля над распространением коронавирусной инфекции [16].

Заключение

Таким образом, в ходе настоящего исследования проведено секвенирование штаммов вируса SARS-CoV-2, выделенных от больных на территории Орловской области. С помощью биоинформационного анализа установлено, что в Орловской области циркулируют штаммы возбудителя новой коронавирусной инфекции, принадлежащие к ветви «В.1.1». Доминирующим вариантом для Орловской области является вариант В.1.1.130. «Британский» (линия В.1.1.7) и «Южноафриканский» (линия В.1.351) варианты коронавируса на дату проведения исследования не выявлены. Вместе с тем, у 53 из 98 изученных образцов (54,1 %) выявлен полиморфизм Е484К Spike-белка, с которым ряд исследователей связывают уклонение от иммунного ответа макроорганизма.

Разработано программное обеспечение для быстрого анализа геномов коронавируса. Установлено, что почти половина циркулирующих штаммов на территории Орловской области принадлежали к генетической линии В.1.1.130 и при этом имели уникальный генотип, не встречавшийся в других регионах мира.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Литература

1. Сперанская А.С., Каптелова В.В., Самойлов А.Е., и др. Генетическая вариабельность SARS-CoV-2 в биологических образцах от пациентов г. Москвы // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2020; 97(6): 511–517. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-1>
2. Каптелова В.В., Сперанская А.С., Самойлов А.Е., и др. Мутации в геномах SARS-CoV-2 биологических образцов, полученных в конце марта- начале апреля от пациентов города Москвы. // Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020. Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием (6–8 октября 2020 года): сборник материалов DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-147>
3. Косырева А.Н., Бакштановская И.В., Степанова Т.Ф., и др. Результаты выявления SARS-CoV-2 и других возбудителей внебольничных пневмоний методом ПЦР в Тюменской области в апреле-июле 2020 г. DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-153>
4. Nagy Á, Pongor S, Györfy B. Different mutations in SARS-CoV-2 associate with severe and mild outcome. *Int J Antimicrob Agents*. 2021; 57(2):106272. doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.106272
5. Walls A, Park Y, Tortorici M, et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein *Cell*. 2020 Apr 16; 181(2):281-292.e6. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
6. Jangra S, Ye C, Rathnasinghe R, Stadlbauer D, Krammer F, Simon V, Martinez-Sobrido L, Garcia-Sastre A, Schotsaert M. The E484K mutation in the SARS-CoV-2 spike protein reduces but does not abolish neutralizing activity of human convalescent and post-vaccination sera. *medRxiv*. 2021 Jan 29:2021.01.26.21250543. doi: 10.1101/2021.01.26.21250543. PMID: 33532796; PMCID: PMC7852247.
7. Liu Z., Zheng H., Lin H. Identification of Common Deletions in the Spike Protein of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *J Virol*. 2020 Aug 17; 94(17):e00790-20. doi: 10.1128/JVI.00790-20.
8. Li, H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 2018. 34:3094-3100. doi:10.1093/bioinformatics/bty191
9. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, et al. The Sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools, *Bioinformatics*, 2009 25(16) 2078-9
10. Grubaugh, N.D., Gangavarapu, K., Quick, et al. An amplicon-based sequencing framework for accurately measuring intrahost virus diversity using PrimalSeq and iVar. *Genome Biol* 20, 8 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1618-7>
11. Elbe S., Buckland-Merrett G. Data, disease and diplomacy: GISAID's innovative contribution to global health. *GlobalChallenges*, 2017 1:33-46 DOI:[10.1002/gch2.1018](https://doi.org/10.1002/gch2.1018)
12. Itokawa K, Sekizuka T, Hashino M, et al. Disentangling primer interaction improves SARS-CoV-2 genome sequencing by multiplexing PCR. *PLoS ONE* 15(9) 2020: e0239403. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239403>

13. Tyson JR, James P, Stoddart D, Sparks N, et al. Improvements to the ARTIC multiplex PCR method for SARS-CoV-2 genome sequencing using nanopore. bioRxiv [Preprint]. 2020 Sep 4:2020.09.04.283077. doi: 10.1101/2020.09.04.283077
14. Указ Президента Российской Федерации от 1 декабря 2016 г. N 642 Стратегия научно-технологического развития Российской Федерации (Собрание законодательства Российской Федерации, 2016, N 49, ст. 6887).
15. Краснов Я.М., Попова А.Ю., Сафронов В.А., и др. Анализ геномного разнообразия SARS-CoV-2 и эпидемиологических признаков адаптации возбудителя COVID-19 к человеческой популяции (Сообщение 1) // Проблемы особо опасных инфекций. 2020;(3):70-82. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-70-82>
16. Якимова А.О., Чеботарёва И.В., Кирюшина Д.Ю., и др. Изменчивость SARS-CoV-2 как фактор потери контроля над распространением коронавирусной инфекции. DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-192>

References

1. Speranskaya A.S., Kaptelova V.V., Samoilov A.E., et al. Genetic variability of SARS-CoV-2 in biological samples from patients in Moscow //Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii 2020; 97(6) doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-1 (In Russian)
2. Kaptelova V.V., Speranskaya A.S., Samoilov A.E., et al. Mutations in the genomes of SARS-COV-2 from clinical samples obtained in late march-early april from patients in Moscow // Molecular Diagnostics and Biosafety – 2020. Russian national scientific and practical conference with international participation (October, 6–8, 2020) DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-147> (In Russian)
3. Kosyreva A.N., Bakshtanovskaya I.V., Stepanova T.F., et al. Results of detecting SARS-COV-2 and other pathogens of community-acquired pneumonia by PCR in the tyumen oblast in April–July // Molecular Diagnostics and Biosafety – 2020. Russian national scientific and practical conference with international participation (October, 6–8, 2020) DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-153> (In Russian)
4. Nagy Á, Pongor S, Györffy B. Different mutations in SARS-CoV-2 associate with severe and mild outcome. Int J Antimicrob Agents. 2021;57(2):106272. doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.106272
5. Walls A, Park Y, Tortorici M, et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Cell. 2020 Apr 16;181(2):281-292.e6. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
6. Jangra S, Ye C, Rathnasinghe R, Stadlbauer D, Krammer F, Simon V, Martinez-Sobrido L, Garcia-Sastre A, Schotsaert M. The E484K mutation in the SARS-CoV-2 spike protein reduces but does not abolish neutralizing activity of human convalescent and post-vaccination sera. medRxiv. 2021 Jan 29:2021.01.26.21250543. doi: 10.1101/2021.01.26.21250543. PMID: 33532796; PMCID: PMC7852247.

7. Liu Z., Zheng H., Lin H. Identification of Common Deletions in the Spike Protein of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *J Virol.* 2020 Aug 17;94(17):e00790-20. doi: 10.1128/JVI.00790-20.
8. Li, H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 2018. 34:3094-3100. [doi:10.1093/bioinformatics/bty191](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty191)
9. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, et al. The Sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools, *Bioinformatics*, 2009 25(16) 2078-9
10. Grubaugh, N.D., Gangavarapu, K., Quick, et al. An amplicon-based sequencing framework for accurately measuring intrahost virus diversity using PrimalSeq and iVar. *Genome Biol* 20, 8 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1618-7>
11. Elbe S., Buckland-Merrett G. Data, disease and diplomacy: GISAID's innovative contribution to global health. *GlobalChallenges*, 2017 1:33-46 DOI:[10.1002/gch2.1018](https://doi.org/10.1002/gch2.1018)
12. Itokawa K, Sekizuka T, Hashino M, et al. Disentangling primer interaction improves SARS-CoV-2 genome sequencing by multiplexing PCR. *PLoS ONE* 15(9) 2020: e0239403. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239403>
13. Tyson JR, James P, Stoddart D, Sparks N, et al. Improvements to the ARTIC multiplex PCR method for SARS-CoV-2 genome sequencing using nanopore. *bioRxiv* [Preprint]. 2020 Sep 4:2020.09.04.283077. doi: 10.1101/2020.09.04.283077
14. Decree of the President of the Russian Federation of December 1, 2016 N 642 Strategy for the scientific and technological development of the Russian Federation (Collected Legislation of the Russian Federation, 2016, N 49, art. 6887). (In Russian)
15. Krasnov Y.M., Popova A.Yu., Safronov V.A., et al. Genomic Diversity Analysis of SARS-CoV-2 and Epidemiological Features of Adaptation of COVID-19 Agent to Human Population (Communication 1). *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2020;(3):70-82. (In Russ.) <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-70-82> (In Russian)
16. Yakimova A.O., Chebotareva I.V., Kiryushina D.Yu. Variability of SARS-COV-2 as a factor of control loss over the distribution of coronavirus infection // *Molecular Diagnostics and Biosafety – 2020*. Russian national scientific and practical conference with international participation (October, 6–8, 2020) DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-192> (In Russian)