



### ЗАГАДКИ НОВОГО КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2

<sup>1</sup>Мавзютов А.Р.\*, <sup>2</sup>Гарафутдинов Р.Р., <sup>3</sup>Халикова Е.Ю., <sup>1</sup>Газизов Р.Р., <sup>1,2</sup>Баймиев Ан.Х.,  
<sup>2</sup>Никоноров Ю.М., <sup>2</sup>Максимов И.В., <sup>1,2</sup>Кулуев Б.Р., <sup>1,2</sup>Баймиев Ал.Х., <sup>2</sup>Чемерис А.В.

<sup>1</sup>Башкирский государственный медицинский университет, Россия, 450008, Уфа, ул. Ленина, 3

<sup>2</sup>Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра  
Российской академии наук, Россия, 450054, Уфа, проспект Октября, 71

<sup>3</sup>Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова  
Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

\*Email: [ufalab@mail.ru](mailto:ufalab@mail.ru)

#### Резюме

Появление нового коронавируса SARS-CoV-2 породило множество загадок, на которые на все пока нет ответов. Однако степень угрозы человечеству, обусловленная тем, что к началу февраля 2021 г. в мире переболело более 100 миллионов человек, из которых 2 миллиона умерло, привела к тому, что усилия очень многих исследователей оказались направлены на борьбу с этой болезнью, включая массовое секвенирование полных геномов SARS-CoV-2, поскольку это необходимо для диагностики и прогнозирования эпидемиологической ситуации, в том числе в долгосрочной перспективе. В настоящее время показан довольно высокий уровень консервативности генома SARS-CoV-2, но имеется и значительная вариабельность внутрихозяйской вирусной РНК, подтверждающая концепцию существования квазивидов для РНК-содержащих вирусов. По состоянию на февраль 2021 г. в мире секвенированы полные геномы почти полумиллиона изолятов нового коронавируса, для упорядочения анализа которых предложен ряд номенклатур, включающий удобную динамическую номенклатуру Pango lineage. Продемонстрированы вариации геномов SARS-CoV-2 в виде консенсусных SNP (Single Nucleotide Polymorphism) и внутрихозяйских iSNV (intra-host Single Nucleotide Variant). С учетом iSNV и минорных мутаций, из 29,9 тысяч нуклеотидов вирусного генома к настоящему времени хотя бы однажды были изменены около 85% его нуклеотидов, но лишь очень немногие из них, благодаря определенным особенностям, обеспечивающим преимущественное распространение таких штаммов, превратились в мажорные мутации. На примере гена S-белка с учетом iSNV, минорных и мажорных мутаций показана его значительная вариабельность, обнаруживаемая при секвенировании сотен тысяч геномов SARS-CoV-2. На основе анализа 400 полных геномов SARS-CoV-2, выделенных на территории Российской Федерации в течение 2020 г., оценена динамика циркуляции отдельных штаммов с приобретенными мажорными мутациями, представленность которых несколько отличается от происходящих изменений генома SARS-CoV-2 в остальном мире. Отмечена возможность длительной персистенции нового коронавируса в организме человека, при этом резервуары для вероятного латентного существования SARS-CoV-2, в отличие, например, от вируса герпеса, остаются неизвестными. Нет единого мнения и о возможности реактивации SARS-CoV-2 или реинфекции. Последнее теоретически возможно в тех случаях, когда в организме «повторно инфицированных» обнаруживаются штаммы SARS-CoV-2, относящиеся к другим генетическим линиям икладам. Это, однако, не исключает возможность мутирования вируса внутри одного хозяина. Несмотря на значительный прогресс в мониторинге распространения SARS-CoV-2, еще остается немало вопросов, но по мере накопления знаний о биологии нового коронавируса на них также непременно будут даны ответы.

**Ключевые слова:** коронавирус, SARS-CoV-2, квазивид, геном, РНК, секвенирование, S-белок, консенсусные мутации, внутрихозяйские мутации, SNP, iSNV, персистенция, реинфекция, COVID-19

**Цитирование:** Мавзютов А.Р., Гарафутдинов Р.Р., Халикова Е.Ю., Газизов Р.Р., Баймиев Ан.Х., Никоноров Ю.М., Максимов И.В., Кулуев Б.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Загадки нового коронавируса SARS-CoV-2 // Биомика. 2021. Т.13(1). С. 75-99. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-7

© Автор(ы)

## THE ENIGMAS OF THE NEW CORONAVIRUS SARS-CoV-2

<sup>1</sup>Mavzyutov A.R.\*, <sup>2</sup>Garafutdinov R.R., <sup>3</sup>Khalikova E. Yu., <sup>1</sup>Gazizov R.R., <sup>1,2</sup>Baymiev An.Kh.,  
<sup>2</sup>Nikonorov Yu.M., <sup>2</sup>Maksimov I.V., <sup>1,2</sup>Kuluev B.R., <sup>1,2</sup>Baymiev Al.Kh., <sup>2</sup>Chemieris A.V.

<sup>1</sup>Bashkir State Medical University, 3 Lenina Str., 450008, Ufa, Russia

<sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences,  
71 Pr. Oktyabrya, 450054, Ufa, Russia, E-mail: [chemieris@anrb.ru](mailto:chemieris@anrb.ru)

<sup>3</sup>I.M.Sechenov First Moscow State Medical University, 8-2 Trubetskaya str. Moscow, 119991, Russia

### Resume

The emergence of the new SARS-CoV-2 coronavirus has given rise to many enigmas, to which there are no answers yet. However, the degree of threat to humanity, due to the fact that by the beginning of February 2021, more than 100 million people were ill in the world, of which 2 million died, led to the fact that the efforts of many researchers were aimed at combating this disease, including massive sequencing of the complete genomes of SARS-CoV-2, as this is necessary for diagnostics and prediction of the epidemiological situation, including in the long term. Currently, a fairly high level of conservativeness of the SARS-CoV-2 genome is shown, but there is also a significant variability of intra-host viral RNA, confirming the concept of the existence of quasispecies for RNA-containing viruses. As of February 2021, the complete genomes of almost half a million coronavirus isolates have been sequenced worldwide, and a number of nomenclatures have been proposed to streamline their analysis, including the convenient dynamic nomenclature Pango lineage. Variations of SARS-CoV-2 genomes in the form of consensus SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) and intra-host iSNVs (intra-host Single Nucleotide Variant) were demonstrated. Taking into account iSNV and minor mutations, about 85% of the 29.9 thousand nucleotides viral genome were changed at least once, but only a very few of them turned into major mutations due to certain features that ensure the predominant distribution of such strains. The example of the S-protein gene, taking into account iSNV, minor and major mutations, shows its significant variability, which is detected when sequencing hundreds of thousands of SARS-CoV-2 genomes. On the basis of the analysis of 400 complete SARS-CoV-2 genomes isolated on the territory of the Russian Federation during 2020, the dynamics of the circulation of individual strains with acquired major mutations, the representation of which is slightly different from the changes in the SARS-CoV-2 genome in the rest world, is estimated. The possibility of long-term persistence of the new coronavirus in the human body is note, while the reservoirs for the latent existence of SARS-CoV-2, in contrast, for example, to the herpes simple virus, remain unknown. There is no consensus on the possibility of reactivation of SARS-CoV-2 or reinfection. The latter is theoretically possible in cases where SARS-CoV-2 strains belonging to other genetic lineages and clades are found in the body of the "re-infected". This, however, does not exclude the possibility of mutating the virus within a single host. Despite significant progress in monitoring the spread of SARS-CoV-2, many questions remain, but as knowledge of the biology of the new coronavirus accumulates, they will also be answered.

**Keywords:** coronavirus, SARS-CoV-2, quasispecies, genome, RNA, sequencing, S-protein, consensus mutations, intrahost mutations, SNP, iSNV, persistence, reinfection, COVID-19

**Citation:** Mavzyutov A.R., Garafutdinov R.R., Khalikova E. Yu., Gazizov R.R., Baymiev An.Kh., Nikonorov Yu.M., Maksimov I.V., Kuluev B.R., Baymiev Al.Kh., Chemieris A.V. The enigmas of the new coronavirus SARS-CoV-2. *Biomics*. 2021. V.13(1). P. 75-99. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-7 (In Russian)

© The Author(s)

### Введение

Мы уже неоднократно обращались к теме новой коронавирусной инфекции, кратко рассмотрев ранее систематику бетакоронавирусов, геномную организацию SARS-CoV-2, предположительное происхождение этого вируса, его молекулярную диагностику, в том числе проблемные вопросы, включая образование ложноотрицательных

результатов, а также готовящиеся вакцины [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2020; 2020a; Мавзютов и др. (Mavzyutov et al.), 2020]. В тех наших статьях было обращено также внимание на небывалый рост числа публикаций в этой области. Так, за 2020 г. статей по коронавирусам (преимущественно нового вида) в базе данных PubMed при использовании при поиске части названия этого вируса в виде "SARS"

находится более 30 тысяч, или в среднем две с половиной тысячи статей за месяц. При этом только в январе 2021 г. подобных работ уже вышло свыше 5 тысяч. При поиске в PubMed статей со словом “COVID-19” таковых обнаруживается уже более 100 тысяч, и только на январь 2021 г. приходится свыше 15 тысяч. Если такие темпы сохранятся, то количество подобных статей в 2021 г. вероятно приблизится к двумстам тысячам. Для оценки масштабов проводимых исследований по SARS-CoV-2 можно привести для сравнения хантавирусы, вызывающие геморрагическую лихорадку с почечным синдромом. Так, в 2020 г. в PubMed имелось не более полутора сотен статей со словом “hantavirus”<sup>1</sup> и меньше двух десятков - за январь 2021 г., что в тысячу раз меньше количества работ по коронавирусной тематике.

К числу загадок, связанных с коронавирусом, можно отнести его происхождение и промежуточных хозяев, которыми по одной из версий считаются панголины. Однако до настоящего времени неясно, где и как, причем неодномоментно, пересекались эти зверьки с летучими мышами, поскольку у них разные среды обитания. Другой загадкой можно считать появление у SARS-CoV-2 уникального фуринового сайта в шиповидном белке, существенно облегчающем проникновение вируса через слизистые в организм человека. Для этого были нужны многочисленные рекомбинационные события или множественные мутации вирусного генома, чему пока нет убедительных доказательств. При этом ответы на многие вопросы, от персистенции вплоть до эффективности лечения, может помочь раскрыть изучение биоразнообразия SARS-CoV-2.

В конце мая 2020 г. большим коллективом авторов из разных стран был подготовлен глобальный компендиум, содержащий 150 вопросов по коронавирусу SARS-CoV-2, сгруппированных в 9 секций, и краткие ответы на них, насколько в тот момент позволяли имеющиеся знания [Riggioni et al., 2020]. В частности, при ответе на вопрос о продолжительности персистенции вируса упомянут срок в 37 дней, тогда как сейчас известно, что она может быть значительно дольше. Про реинфекцию и тем более реактивацию нового коронавируса в данном компендиуме практически не говорится, притом, что в настоящее время это один из основных вопросов при циркуляции SARS-CoV-2 [Alvarez-Moreno, Rodriguez-Morales, 2020]. Тем не менее, та подборка вопросов и ответов на них до сих пор может быть полезна тем, кто впервые знакомится с коронавирусной тематикой.

Прежде всего, стоит коснуться используемых в вирусологии обозначений, тем более, что не существует универсального подхода к классификации генетического разнообразия вирусов ниже уровня вида, и это не входит в компетенцию International Committee on Taxonomy of Viruses. Так, изолятом принято считать образец, взятый у больного; группа одинаковых изолятов, например, по нуклеотидной последовательности, может считаться вариантом или геновариантом вируса, генотипом вируса, субтипом, серотипом (хотя последний термин обычно используется, когда изоляты типированы с помощью антител). При этом четко очерченная группа изолятов, несущая принципиально охарактеризованные отличия от других им подобных вирусов, будет/может считаться штаммом, генетической линией или линией родословных. При филогенетических построениях некая группа схожих штаммов или линий будет формировать ветвь, кластер, субкладу, кладу, и здесь все зависит от величины этой группы, наличия родственных ей групп и их эволюционных взаимоотношений. Причем, применительно к коронавирусу SARS-CoV-2 в разных статьях можно встретить практически все эти обозначения. Поэтому мы также будем применять здесь по отношению к новому коронавирусу разные определения, стремясь при упоминании конкретных публикаций использовать те же термины, что и сами авторы тех статей.

Также следует кратко напомнить организацию генома этого РНК-вируса (рис. 1), тем более, что далее по тексту будут упоминаться некоторые его гены. Итак, SARS-CoV-2 представлен единой молекулой одноцепочечной РНК длиной около 29,9 тысяч нуклеотидов и имеет на 5'- и 3'-концах короткие нетранслируемые участки, а также небольшую поли(А)-последовательность (на рис. 1 не показаны). Первая открытая рамка считывания занимает свыше двух третей всего генома и кодирует 16 неструктурных белков (NSP), изначально организованных в два полипептида 1a и 1b, обеспечивающих процессы как репликации, так и транскрипции. Далее следуют четыре гена, кодирующие структурные белки – белок зубца короны S (spike), малый белок оболочки E (envelope), мембранный гликопротеин M (membrane), нуклеокапсидный белок N (nucleocapsid), перемежающиеся целым рядом генов вспомогательных белков, функции которых еще не всех ясны. Геном SARS-CoV-2, как и других коронавирусов может быть упрощенно записан следующим образом – 5'-UTR-ORF1a/b-S-E-M-N-UTR-3'-polyA.

<sup>1</sup> Всего в базе данных PubMed за 60 с лишним лет статей со словом ‘hantavirus’ имеется около 4,5 тысяч, первая из которых датирована 1959 г.

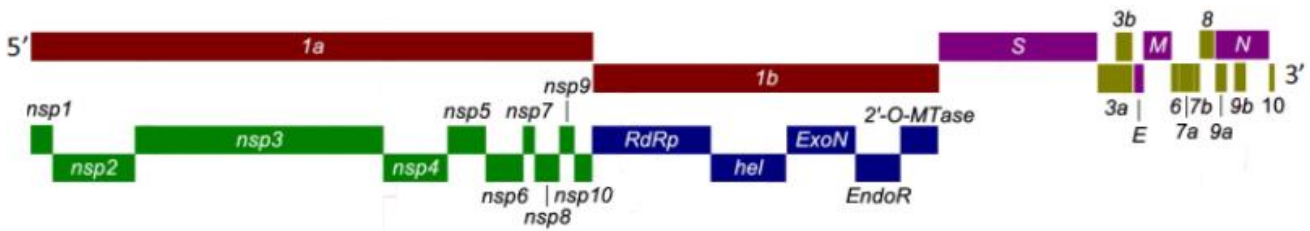


Рис. 1. Упрощенная схема организации коронавируса генома  
Fig. 1. Simplified scheme of the coronavirus genome organization

Появился этот коронавирус SARS-CoV-2 полвека назад, человечество ждала бы самая настоящая катастрофа, поскольку тогда еще не было современных средств молекулярной диагностики, и определение последовательностей нуклеиновых кислот по производительности уступало нынешнему, по меньшей мере, в миллиард раз. О секвенировании любых полных геномов, включая вирусные, могли мечтать в то время лишь самые отчаянные оптимисты. Даже еще в начале наступившего тысячелетия секвенирование полных геномов представляло довольно серьезную проблему, и для появившегося в ноябре 2002 г. коронавируса SARS-CoV были определены нуклеотидные последовательности всего нескольких десятков изолятов. Другой причиной ограниченного количества секвенированных геномов того коронавируса послужило еще и то, что он почти бесследно пропал летом 2003 г. Что касается настоящего времени, то по состоянию на начало февраля 2021 г., согласно базе данных GISAID - Global Initiative on Sharing All Influenza Data (<https://www.gisaid.org>), полных геномов SARS-CoV-2 по миру (136 стран) просеквенировано почти полмиллиона. Из них на долю России приходится около двух тысяч. Вместе с тем, такое широкомасштабное секвенирование не является самоцелью и направлено лишь на выяснение циркулирующих на территории конкретных стран тех или иных генотипов SARS-CoV-2 для решения эпидемиологических задач и достоверной диагностики. Причем все эти геномы (включая референсный) по сути консенусные, то есть составлены из многих сотен геномов отдельных вирусов, вовлеченных в процесс секвенирования нуклеотидных последовательностей и выделенных от одного хозяина, что будет обсуждаться дальше при рассмотрении используемых технологий секвенирования коронавирусных геномов.

#### Технологии секвенирования полных геномов изолятов SARS-CoV-2

В настоящее время для определения нуклеотидных последовательностей полных РНК-геномов коронавируса SARS-CoV-2 применяются несколько методов секвенирования ДНК новых поколений (Next Generation Sequencing - NGS), каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки. Поскольку в данном номере журнала имеется обзор, посвященный описанию ряда

технологий полногеномного NGS секвенирования [Зубов и др. (Zubov et al.), 2021], то здесь подробно на этих вопросах останавливаться не будем. Тем не менее, следует заметить, что для секвенирования генома SARS-CoV-2 применяются разные технологии, эксплуатирующие как массовый параллелизм, так и мономолекулярное секвенирование, характеризующиеся соответственно меньшей длиной при более точном прочтении для первых и увеличенной длиной менее точного прочтения для вторых. Из первой группы методов используются флуоресцентное секвенирование на платформе Illumina (преимущественно), или флуоресцентное секвенирование с ДНК-наноболлами на платформе MGI, либо полупроводниковое секвенирование на платформе Ion Torrent, а также некоторые другие технологии. Мономолекулярное секвенирование проводится прохождением ДНК или РНК через нанопоры на платформе Oxford Nanopore Technologies (большая часть), либо с помощью детекции флуоресценции в режиме реального времени на платформе PacBio. При этом для определения нуклеотидной последовательности генома SARS-CoV-2 используется метагеномное секвенирование, ампликонное секвенирование, таргетное секвенирование выхваченных участков генома коронавируса, а также прямое секвенирование вирусной РНК, для чего могут использоваться практически все вышеперечисленные технологии. В ряде случаев находит применение и классическое секвенирование по методу Сэнгера, до сих пор являющееся «золотым» стандартом точности.

Для создания библиотек или для непосредственного секвенирования молекул РНК вирусного генома оценивается количество выделенной РНК. Для этого проводится ОТ-ПЦР в реальном времени и учитывается определяемая в ходе амплификации величина порогового цикла  $C_t$ . Оптимальное количество РНК для полногеномного секвенирования соответствует приблизительно 500–1000 вирусным частицам. Хотя в литературе можно встретить сообщения, что использовали образцы с пороговыми циклами в ПЦР 37 и 22, что приблизительно равно 20 и  $10^5$  копиям геном-эквивалента SARS-CoV-2 [Paden et al., 2020]. Однако при этом показано, что секвенирование образцов с  $C_t$  выше 29 обеспечивало не столь уверенное прочтение.

Не желая глубоко вдаваться в детали процессов секвенирования генома SARS-CoV-2, скажем только, что метагеномное секвенирование, предполагающее этап так называемого «рибоистощения» в виде удаления присутствующей в большом количестве рибосомной РНК, позволяет установить не только последовательность вирусного генома, но и определить геномную составляющую микробиома человека, который, как было обнаружено, несколько меняется при новой коронавирусной инфекции [Mostafa et al., 2020].

Сейчас наиболее широкое применение находит ампликонное секвенирование в силу его относительной простоты и уже подобранных комплектов праймеров. Существует исследовательский Консорциум Artic Network (<https://artic.network>), объединяющий усилия нескольких научных учреждений, преимущественно из Англии, ставящий целью облегчить выявление различных инфекционных агентов, в том числе SARS-CoV-2, включая определение полной нуклеотидной последовательности его генома с использованием, как флуоресцентного секвенирования, так и передовой технологии нанопорового секвенирования с помощью разработанных еще 22 января 2020 г. комплектов праймеров V1 (<https://www.protocols.io/view/ncov-2019-sequencing-protocol-bbmuik6w>), совершенствование которых позволило улучшить прочтение некоторых проблемных участков [Gohl et al., 2020; Itokawa et al., 2020; 2020a; Pillay et al., 2020; Tyson et al., 2020]. Так, появились новые версии комплектов праймеров - V2 (9 апреля 2020 г.) и V3 (25 августа 2020 г.). Если комплект V1 содержал 98 пар праймеров, генерирующих фрагменты генома размерами в среднем около 400 п.н. с приблизительно 80-ти нуклеотидными перекрытиями, не обеспечивая уверенного покрытия всего генома, то в версии V2 за счет некоторого увеличения числа праймеров таких участков стало меньше, и наконец, в третьей версии V3 с еще большим числом праймеров они уже практически отсутствуют. Поскольку при секвенировании на платформе PacBio удается читать довольно длинные последовательности, то для определения нуклеотидной последовательности полного генома SARS-CoV-2 был подобран комплект из всего 29 пар праймеров, ограничивающих для каждой пары приблизительно по 1,2 тысяч нуклеотидов вирусной РНК с небольшим перекрытием. В одной из публикаций сообщается, что ампликоны также размером 1200 п.н. использовались для секвенирования генома SARS-CoV-2 с помощью нанопор [Freed et al., 2020].

Еще одной применяемой для определения нуклеотидной последовательности всего генома SARS-CoV-2 стратегией секвенирования является таргетный подход, рассчитанный на выхватывание из тотальной РНК клетки только вирусного материала за счет его гибридизации с биотинилированными

олигонуклеотидами, представляющими собой комплементарные участки всего вирусного генома и их «экстракции» магнитными частицами с помощью биотин-стрептавидиновой системы. Преимуществом данной стратегии секвенирования SARS-CoV-2 можно считать возможность обходиться меньшим количеством стартового материала вируса, например, с величиной Ct более 30. Другим преимуществом такого таргетного секвенирования можно считать меньшую зависимость от вариаций нуклеотидных последовательностей секвенируемых образцов, поскольку на эффективности гибридизации несущих биотиновые метки олигонуклеотидов замены отдельных нуклеотидов сказываются не так существенно, как на отжиге праймеров при ампликонном секвенировании. Проведено секвенирование полных геномов большого числа вирусных изолятов, в том числе с использованием метода обогащения секвенируемых последовательностей путем их извлечения из раствора с помощью комплекта биотинилированных олигонуклеотидов, комплементарных фрагментам всего генома SARS-CoV-2, производства фирм Integrated DNA Technologies и Twist Bioscience, продемонстрировавших успешность такого подхода [Maurano et al., 2020].

Сравнение эффективности секвенирования полных геномов нескольких клинических образцов SARS-CoV-2 (носоглоточные, ротоглоточные, анальные мазки, мокрота) с помощью трех вышеописанных стратегий (метагеномной, таргетной, ампликонной) с использованием массового параллельного секвенирования с ДНК-наноболлами показало их равноценность, но в разных случаях различные подходы имели некоторые преимущества и недостатки [Xiao et al., 2020]. Определение полных геномов РНК-содержащих вирусов с помощью нанопорового секвенирования позволило установить, в том числе эпигенетический статус генома SARS-CoV-2, а также определить транскриптом вируса [Kim et al., 2020; Taiaroa et al., 2020; Vacca et al., 2020].

Наряду с этими подходами, фирмой ClickSeq Technologies предложен ранее опробованный на других РНК-вирусах способ создания библиотек для секвенирования с помощью клик-химии в виде синтеза кДНК с использованием гексамерных праймеров со случайными последовательностями и последующей терминации строящейся цепи ДНК за счет внедрения 3'-азидонуклеотидов, которые затем лигируются путем образования азидо-алкильных связей [Jaworski et al., 2020]. При этом было показано удобство данного способа изготовления библиотек и одновременно снижение количества образующихся химерных продуктов.

В Российской Федерации для оперативной расшифровки геномов коронавируса SARS-CoV-2, циркулирующих на территории России, с целью мониторинга за изменчивостью вируса под

кураторством НИИ гриппа им. А.А.Сморodinцева создан Российский консорциум по секвенированию геномов коронавирусов (CoRGI - Coronavirus Russian Genetics Initiative) (<https://corgi.center>). Среди его задач: - секвенирование большого числа полных геномов вирусов SARS-CoV-2 от пациентов с COVID-19 из России; - исследование филогенетики и филодинамики SARS-CoV-2 в России и мире; - исследование квазивидового разнообразия вирусов SARS-CoV-2 у пациентов с COVID-19.

#### **Вариабельность генома SARS-CoV-2, квазивид коронавируса SARS-CoV-2**

До появления SARS-CoV-2 ни одна последовательность, будь то ДНК или РНК, не была секвенирована столь большое число раз, и сейчас ученые столкнулись с огромным объемом схожей, но различающейся в деталях информации, которой раньше в таком количестве никогда не было. В настоящее время стандартной практикой обработки данных NGS при анализе вирусных популяций SARS-CoV-2 является некое суммирование всех прочитанных последовательностей каждого образца в единую консенсусную последовательность, тем самым отбрасывается ценная информация о внутривидовом разнообразии вирусов. Так, при секвенировании полных геномов SARS-CoV-2 и установлении их полных нуклеотидных последовательностей после получения черновых данных производится их сборка, которая осуществляется на основе двух принципов – с использованием референсного генома и без него – *de novo*. Первый вариант предполагает, что имеется ранее секвенированный подобный геном, при сравнении с которым нужно наложить на него вновь секвенированные риды и выявить имеющиеся отличия. Этот подход позволяет обходиться меньшим объемом компьютерной памяти, и сама сборка идет гораздо быстрее, но при определении сомнительного нуклеотида (например, встретившегося в риде приблизительно одинаковое число раз) при прочих равных обстоятельствах программа отдаст предпочтение нуклеотиду, уже установленному ранее для референсной последовательности, и это может быть неправильным решением. Вариант *de novo* (который может применяться, невзирая на имеющуюся известную последовательность) требует большего количества черновых данных и компьютерных ресурсов, сборка идет дольше, но при этом он позволяет четче выявлять вариации нуклеотидных последовательностей вирусов, взятых для секвенирования. И вот здесь мы подходим к самому главному - реальному биоразнообразию SARS-CoV-2, не определяемому простым полногеномным секвенированием.

Большинство существующих программ-сборщиков геномов выдают консенсусные последовательности, гаплотипы в которых носят

локальный характер, и длина таковых не превышает длину обычных высокоточных прочтений при проведении секвенирующих процедур. Что касается гаплотипов, имеющих глобальное значение для всего генома, то ввиду различных ограничений нынешних технологий секвенирования (высокая точность, но малая длина для одних и большая длина, но низкая точность прочтений для других) полноценное восстановление полных гаплотипов остается довольно проблематичным, тогда как именно оно позволило бы лучше понимать вариации квазивидов РНК-вирусов, включая SARS-CoV-2, и оценивать истинное биоразнообразие последнего. Недавно для выявления гаплотипов SARS-CoV-2 в данных NGS предложено использовать программу HAPPIPE (HAploType PHyloDynamics PIPEline), позволяющую вести сборку геномов как *de novo*, так и с помощью референсной последовательности и учитывающую не только консенсусные SNP, но и внутривидовые iSNV (intra-host Single Nucleotide Variant) [Bendall et al., 2020; Gibson et al., 2020].

Считается, что новый коронавирус мутирует с относительно невысокой скоростью и от изолята к изоляту отличается на консенсусном уровне преимущественно небольшим числом замен одиночных нуклеотидов (SNP – Single-Nucleotide Polymorphism)<sup>2</sup> – от 1 до 30 со средней величиной 6–7 SNP на геном. При этом какое количество вирусов, взятых в секвенирование, какие конкретно несет мутации остается загадкой. К тому же при прочтении миллионов ридов выбираются лишь нуклеотиды, прочитанные относительно большое количество раз, которые и формируют собой консенсусные SNP. Но помимо них при секвенировании выявляется немало других отличий от референсного генома. В частности, еще для других вирусов ранее было решено, что если тот или иной нуклеотид в конкретном месте встретился более чем в 3% случаев при 400-х кратном покрытии и секвенировании 1000 вирусных частиц, то он уже может считаться iSNV или внутривидовой вариацией вируса, а не ошибками секвенирования [Grubaugh et al., 2019]. В одной из недавних работ наглядно приведены различия между SNP и iSNV для изолятов SARS-CoV-2 [Sapoval et al., 2021]. На рис. 1 мы воспроизводим небольшой фрагмент их иллюстрации, поясняющий, что представляют собой SNP и iSNV для вирусного генома.

<sup>2</sup> Другие отличия изолятов нового коронавируса в виде инделов (indels) здесь нас интересовать не будут (или почти не будут), поскольку их значительно меньше и главная цель данной статьи в другом – показать, что отдельные вирионы у одного хозяина могут отличаться друг от друга, и это нужно принимать во внимание при детекции SARS-CoV-2 и контроле за его персистенцией в организме человека, а также в случаях реинфекции.

Пациент 1 Patient 1	Пациент 2 Patient 2
...ACGTCAG...	...ACGACAG...
...ACGTCAG...	...ACGACAG...
...ACGTCAG...	...ACGACAG...
...ACGTCAG...	...ACGACAG...
...ACGCCAG...	...ACGCCAG...
...ACGCCAG...	...ACGCCAG...

Рис. 2. Различия (количественные) между SNP и iSNV вирусного генома условно SARS-CoV-2 (показаны ничего незначащие фрагменты нуклеотидных последовательностей, которые могли бы принадлежать разным вирусным частицам у одного хозяина). Жирным шрифтом показаны **SNP**, курсивом обозначены *iSNV*

Fig. 2. Differences (quantitative) between the SNP and iSNV of the viral genome SARS-CoV-2 (showing arbitrary fragments of nucleotide sequences that should belong to different viral particles in the same host). Bold indicates **SNP**, italics indicates *iSNV*

Таким образом, приходится иметь дело с некими усредненными последовательностями коронавирусов, где минорные мутации по отношению не только к референсной последовательности, но и к большинству уже ставших известными подобных геномов могут быть присущи только группе вирусов в конкретном человеке, тогда как другие вирионы будут нести геном, вообще не отличающийся от референсной последовательности, ну разве что с мажорными мутациями типа D614G, о которой будет говориться дальше. При этом в некоторых базах данных iSNV продолжают оставаться «за кадром». Поскольку упомянутые выше 6–7 SNP могут быть распределены по совершенно разным вирусным частицам, то с одной стороны, это создает проблему при определении генотипов вирусов, а с другой стороны - при выявлении SARS-CoV-2 с помощью ОТ-ПЦР, несмотря на наличие у вирусов множества отдельных мутаций, препятствующих отжигу праймеров, в препарате теоретически будет/может присутствовать часть вирионов с неизменными нуклеотидными последовательностями, пригодными для отжига на них ранее подобранных праймеров для амплификации и последующего обнаружения вируса<sup>3</sup>. Касательно мажорных мутаций (когда-то бывших минорными, но в силу придания ими преимуществ вирусу при его размножении и распространении ставших превалирующими), которые реально могут мешать протеканию ПЦР, то о них речь пойдет дальше. Все существующие методы генотипирования, включая

<sup>3</sup> Почему имеют место случаи невыявления присутствия SARS-CoV-2 с помощью ПЦР, несмотря на то, что все свидетельствует о его наличии у пациента, мы обсуждали в предыдущей нашей статье по коронавирусу [Мавзютов и др. (Mavzyutov et al.), 2020].

выявление SNP и iSNV, имеют большое прикладное значение для обнаружения источников инфекции и анализа путей распространения вируса на различных территориях. При этом iSNV, если они будут обеспечивать вирусу некое преимущество при размножении, могут превратиться сначала в минорные SNP, а потом и в мажорные мутации.

Значительный объем неизвестной ранее информации о различиях нуклеотидных последовательностей коронавирусного генома позволил несколько иначе взглянуть на эволюцию вирусов в целом. Так, этим «формам Жизни», и в особенности представленным РНК-последовательностями, понятие «вида» как четкой таксономической единицы, как оказалось, может быть применимо лишь весьма условно, поскольку они представляют собой самые настоящие «квазивиды». Если в первые недели и месяцы секвенирования полных геномов SARS-CoV-2 изоляты даже на разных континентах демонстрировали полное или почти полное совпадение с референсным геномом, то с увеличением масштаба секвенирования геномов SARS-CoV-2 и с их все большим географическим распространением по миру стало ясно, что различий намного больше. И это при том, что коронавирусы в отличие от других РНК-содержащих вирусов обладают редактирующей активностью, снижающей при репликации число ошибок их РНК-зависимой РНК-полимеразы. В этой связи стоит обратить внимание на мутации в гене NSP14 коронавируса, кодирующим в том числе экзорибонуклеазу EhoN, отвечающую за точность репликации. В одной из таких работ сообщается, что несинонимичные мутации в этом гене (хотя их выявлено пока немного) приводят в целом к увеличению числа мутаций всего вирусного генома [Eskier et al., 2020].

Таким образом, понятие квазивид для SARS-CoV-2 после расширения знаний о нем (его геномах) к этому коронавирусу вполне применимо. Вообще концепция квазивид в биологии, возникшая еще до появления относительно производительного секвенирования нуклеиновых кислот, насчитывает уже более полувека [Eigen, 1971], но данные 2020 г. по секвенированию генома нового коронавируса убеждают в «квазивидности» РНК-вирусов полностью не только в теории [Lauring, Andino, 2010], но теперь и на практике. Таким образом, можно считать, что широкомасштабное секвенирование изолятов SARS-CoV-2 окончательно ответило на вопрос относительно квазивидов РНК-вирусов. Можно не сомневаться, что генетическое разнообразие вирусных частиц SARS-CoV-2 возможно даже в одной инфицированной клетке, поскольку такое было ранее показано для других вирусов (хотя и абсолютно в несопоставимых с SARS-CoV-2 масштабах) и детально рассмотрено в относительно недавнем обзоре [Rato et al., 2017].

Убедительными свидетельствами того, что SARS-CoV-2 представляет собой квазивид, служат работы, в которых массово выявлена внутрихозяйская вариабельность коронавируса в виде iSNV различий в его геноме. Однако этим вопросам внимание преимущественно стало уделяться только в последнее время, и в целом ряде недавних публикаций подчеркивается важность таких исследований, в том числе для оценки действия антивирусных препаратов и вакцин на разные генотипы SARS-CoV-2 и вызываемые уже под их действием мутации [Armero et al., 2021; Valesano et al., 2021; Wang et al., 2021]. Подчеркивается важная роль внутрихозяйских мутаций для эволюционирования SARS-CoV-2 [Wang et al., 2021a]. Хотя справедливости ради, следует признать наличие нескольких более ранних публикаций, в которых сообщалось об исследовании внутрихозяйской вариабельности изолятов SARS-CoV-2, причем выделяемых из разных тканей организма человека. Так, было идентифицировано 229 iSNV при секвенировании вирусных геномов из 18 фекальных образцов [Xu et al.,

2020]. Внутрихозяйские отличия iSNV в виде трех однонуклеотидных замен между вариантами коронавируса у одного пациента нашли в образцах из фекалий, по сравнению с мазками из верхних дыхательных путей и мокроты (которые были одинаковы), на основании чего авторы сделали вывод об имевшей место инфекции двумя вариантами вирусов [Du et al., 2020], хотя нельзя исключить и произошедшие мутации уже внутри данного пациента, адаптированные к размножению в разных органах. Тем более, что при сравнении разнообразия SARS-CoV-2 в дыхательном и желудочно-кишечном трактах оказалось, что в последнем выявляется большее количество iSNV [Wang et al., 2021].

Для демонстрации всевозможных вариаций вирусного генома SARS-CoV-2 можно привести ген S-белка, как определяющего взаимодействие RBD (Receptor Binding Domain) участка спайкового белка с рецептором ACE2, обеспечивающего проникновение вируса через слизистые в клетки человека.

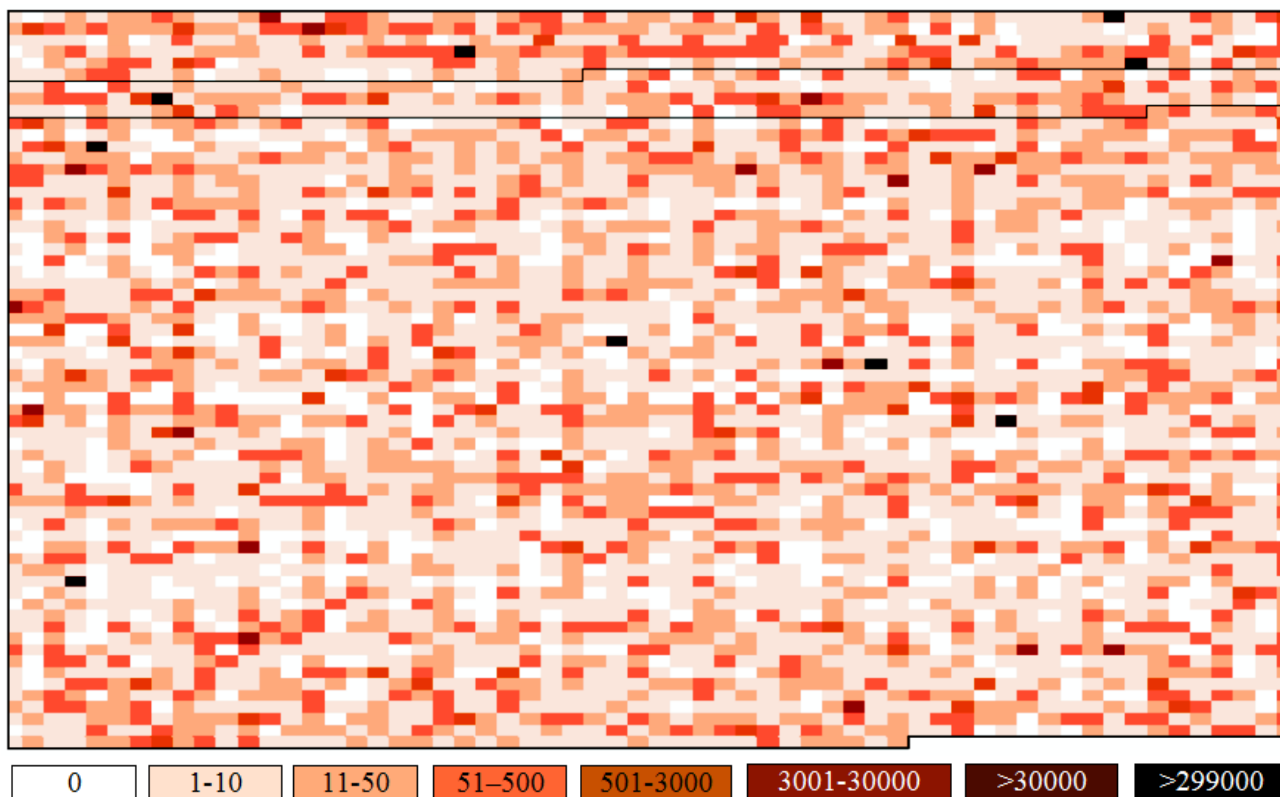


Рис. 3. Вариации (SNP и iSNV) гена S-белка SARS-CoV-2. Маленькие прямоугольники символизируют отдельные нуклеотиды. Рецептор-связывающий домен взят в рамку. Цветная шкала показывает число замен, приходящихся в данном гене на конкретный нуклеотид, в виде прямоугольника, выделенного соответствующим цветом.

Fig. 3. Variations (SNP and iSNV) of the SARS-CoV-2 S-protein gene. The small rectangles represent the separate nucleotides. The receptor-binding domain is framed. The color scale shows the number of substitutions in this gene per specific nucleotide as the rectangle highlighted in the corresponding color.

Ген S-белка коронавируса SARS-CoV-2 размером 3822 нуклеотида, как можно видеть из рис. 3, на котором он приведен по 60 нуклеотидов в строку, весьма вариабелен и на основе анализа всех секвенированных в мире полных геномов к началу февраля (около полумиллиона изолятов) оказывается, что 85% нуклеотидов этого гена хотя бы раз, но заменились. При этом нет ни одного относительно протяженного участка, которого бы это не коснулось. В целом можно констатировать, что более подвержено заменам начало данного гена, кодирующее субъединицу S1, тогда как вторая часть, кодирующая субъединицу S2, несколько консервативнее. Что касается домена, ответственного за связывание с ACE2 рецептором, то он также довольно сильно вариабелен. Здесь нужно заметить, что если бы было секвенировано еще большее количество изолятов SARS-CoV-2, то возможно не осталось бы ни одного неизменившегося, хотя бы раз нуклеотида, как в гене S-белка, так возможно и во всем геноме.

### Номенклатуры SARS-CoV-2

Первые сотни секвенированных полных геномов SARS-CoV-2 хотя и показывали вариабельность нового коронавируса, но в то же время, как уже говорилось выше, демонстрировали и его довольно малую изменчивость, благодаря чему изоляты с разных континентов имели минимальные отличия от референсного штамма или вообще от него не отличались. В начале марта 2020 г. база данных GISAID содержала информацию о приблизительно 250 полных геномах SARS-CoV-2, и со 160 из них был проведен филогенетический анализ, показавший, что разошедшиеся к тому времени по миру коронавирусы сформировали три типа, обозначенных как А, В и С, из которых наиболее близкий предковому типу из летучей мыши штамму RaTG13 был обозначен как А [Forster et al., 2020]. И это оказалось первой попыткой подразделения изолятов нового коронавируса на группы. Когда счет секвенированных геномов пошел на десятки тысяч, то стало ясно, что вирус все же довольно заметно мутирует, в том числе и потому, что его количество на Планете стало гигантским. Так, было подсчитано, что в больном индивиде одновременно в разгар болезни может содержаться  $10^9 - 10^{11}$  вирионов [Sender et al., 2020], и если переводить на всех носителей, то к настоящему времени с учетом 100 млн. переболевших и еще большего числа бессимптомных носителей можно допустить, что вирусных частиц в общей сложности за прошедший год было образовано чуть ли не секстиллион ( $10^{21}$ ). В цитируемой публикации был оценен суммарный вес всех вирусов, который, по их мнению, в ноябре 2020 г. мог достичь даже одного килограмма. И это конечно очень много! Поэтому не следует удивляться большому разнообразию

нуклеотидных последовательностей коронавирусного генома, несмотря на высокую точность его репликации. Можно сказать, что количество перешло в качество, под которым в данном случае следует понимать вариации нуклеотидных последовательностей коронавирусного генома SARS-CoV-2, среди которых неизбежно появляются обладающие более хорошими (для вируса) характеристиками, закрепляющимися в популяции.

Чтобы разобраться в огромном многообразии секвенированных последовательностей, было необходимо выработать подходящую номенклатуру, и таковых предложено уже несколько. Так, упоминавшаяся база данных GISAID, аккумулирующая наиболее полную информацию о секвенированных геномах нового коронавируса, использует буквенную номенклатуру (<https://www.gisaid.org/references/statements-clarifications/clade-and-lineage-nomenclature-aids-in-genomic-epidemiology-of-active-hcov-19-viruses/>), подразделяющую SARS-CoV-2 на 8 клад с учетом времени их появления и филогенетических взаимоотношений – S, L, V, G, GH, GR, GV, GRY (иногда выделяют также кладу O (Others)). Еще одна база данных Nextstrain (<https://nextstrain.org/blog/2020-06-02-SARSCoV2-clade-naming>) подразделяет SARS-CoV-2 на еще более крупные группы – 19A, 19B, 20A, 20B, 20C, 20I. Эти номенклатуры носят масштабный характер и отражают уже устоявшиеся группы штаммов нового коронавируса, циркулирующие, по крайней мере, в течение нескольких месяцев и распространившиеся по миру. Однако для контроля за новыми вариантами SARS-CoV-2, когда полных секвенированных геномов уже было известно около 35 тысяч, чтобы окончательно не запутаться в их разнообразии, срочно потребовался другой подход, предложенный летом 2020 г., в виде динамической номенклатуры, четко и чутко реагирующей на постоянное появление все новых линий этого вируса [Rambaut et al., 2020]. Ее главным преимуществом является иерархический характер, отражающий эволюцию вирусов SARS-CoV-2, и возможность отслеживать появление и глобальное распространение все новых вариантов этого вируса. Были выработаны правила обозначения линий родословных, начинающихся с префикса в виде буквы, после которой идет суффикс, состоящий из цифр, формирующих не более чем три иерархических подуровня. Например, имеется линия B.1.1.1, но не может существовать линии B.1.1.1.1, поскольку она превращается в линию C.1. В настоящее время биоразнообразие SARS-CoV-2 настолько велико, что на сайте <https://cov-lineages.org/lineages.html> уже есть линии, начинающиеся с префикса Z, но при этом из-за некоторого визуального совпадения с арабскими и

римскими цифрами буквы I, O и X не используются в префиксах имен стандартных линий. Для упорядочения ведения данной номенклатуры подготовлен специальный биоинформатический инструмент PANGOLIN 2.0 (Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages) с улучшенным алгоритмом pangoleARN. Однако некоторое время спустя этой же группой авторов было опубликовано дополнение [Rambaut et al., 2021] к своей предыдущей статье [Rambaut et al., 2020], в котором они дали разъяснение относительно названия динамической номенклатурной системы для линий SARS-CoV-2, предложив не называть ее номенклатурной системой Pangolin, поскольку это может быть неверно истолковано как относящейся к виду-хозяину нового коронавируса, а не к родословным SARS-CoV-2, и поэтому рекомендовали использовать словосочетание PANGO lineage. Эта динамическая номенклатура нашла широкое применение, поскольку действительно удобна для контроля за вновь появляющимися линиями SARS-CoV-2 [Cella et al., 2021].

Наконец, агентство Public Health England (PHE) при Департаменте здравоохранения и социального обеспечения Великобритании (<https://www.gov.uk/government/publications/investigation-of-novel-sars-cov-2-variant-variant-of-concern-20201201>) стало использовать свою номенклатуру. Так, варианты SARS-CoV-2, находящиеся на рассмотрении, получают обозначение VUI (Variant Under Investigation), а те, которые эту стадию уже преодолели, обозначаются VOC (Variant of Concern) и к этим аббревиатурам добавляется информация в виде года, месяца и порядкового номера. Так, например, Pango линия B.1.1.7 имеет PHE шифр VOC-20DEC-01, а более новая линия B.1.525 – VUI-21FEB-03.

### Мутационная изменчивость SARS-CoV-2

Поскольку на SARS-CoV-2 действует естественный отбор, связанный не только с его вирулентностью к организму и с иммунной системой человека, но и с тяжестью заболевания (сильно больные изолируются в больницах, легкобольные продолжают разносить инфекцию), то коронавирус может приобретать благоприятные для себя мутации, способствующие вытеснению предыдущих штаммов. Одной из первых, появившихся еще зимой 2020 г. мажорных мутаций коронавирусного генома стала несинонимичная мутация A23403G в гене S-белка, приводящая на белковом уровне к замене в 614 положении аминокислотной последовательности аспарагиновой кислоты (D) на глицин (G) – D614G. Место в S-белке, на которое приходится данная мутация, расположено недалеко от границы S1 и S2 субъединиц этого белка и оказывается в зоне, находящейся в липидном слое вирусной частицы. При этом аминокислота глицин по размеру намного меньше аспарагиновой кислоты, что может для

функционирования вируса иметь определенное значение, например, в виде увеличенной плотности белка в этом месте. Уже к концу весны 2020 г. во многих странах Европы и Америки эта мутация оказалась преобладающей за счет лучшей трансмиссивности несущего ее коронавируса [Platto et al., 2020], а к концу июня 2020 г. 91,5% пациентов в США были заражены именно 614G вирусом [Kannan et al., 2020]. На африканском континенте к июлю 2020 г. более 82% циркулирующих штаммов несли мутацию D614G [Motuao et al., 2021]. Молекулярные механизмы, лежащие в основе увеличенной трансмиссивности штаммов с 614G, до сих пор до конца неясны, но есть ряд предположений, краткий обзор которых приведен в одной из работ, но при этом оговаривается, что четкого экспериментального подтверждения ни для одной из них не получено [Jackson et al., 2020]. При этом нельзя исключать, что приводящие к большей контагиозности (заразности) коронавирусов с генотипом 614G разные механизмы или только часть из них, могут действовать одновременно. К таковым можно отнести более эффективное за счет измененной конформации разрезание протеазами S-белка на две его субъединицы S1 и S2, что является неременным условием проникновения вируса в клетку, увеличенную прочность удержания этих шиповидных S-белков в липидном слое вируса и большее число S-белков (точнее их S1 субъединиц) на поверхности коронавируса и, как следствие, увеличение вероятности контакта рецептор-связывающего домена RBD S-белка с ACE2 рецептором клеток человека, а также возникновение конформации S-белка, способствующей лучшему взаимодействию домена RBD с ACE2. Как бы то ни было – факт увеличенной трансмиссивности линии 614G SARS-CoV-2 остается фактом, что подтверждается также специальными исследованиями, где на культуре клеток человека *in vitro* было показано преимущественное размножение варианта вируса 614G [Baric, 2020]. В этой же работе сообщается об интраназальном инфицировании хомячков, в том числе смесью 614D и 614G коронавирусов, в результате чего через несколько дней титр последнего варианта оказывался у них заметно выше.

Другой мутацией, также быстро вытеснившей во многих странах прежние штаммы, явился коронавирус, в котором произошла замена A23064C (N501Y), приведшая к замене в S-белке аминокислоты аспарагина на тирозин (<https://virological.org/t/preliminary-genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-the-uk-defined-by-a-novel-set-of-spike-mutations/563>). Опасность этой мутации заключается в том, что она приходится на RBD домен S-белка вируса, и эта аминокислота является одной из шести, непосредственно контактирующих с ACE2

рецептором слизистых тканей человека. Данная мутация 501Y (или еще иначе 501Y Variant 1), была впервые обнаружена в Уэльсе, где ее пропорция не превышала 2%, однако после того как в дополнение к этой мутации в таком вирусе появилось много новых мутаций, то ему было присвоено обозначение 501Y.V2, и с начала октября до начала ноября пропорция этого вируса среди полных секвенированных за это время геномов в базе данных GISAID составила уже 49,7% [Leung et al., 2021]. Этот вариант вируса, назвав британским штаммом, отнесли к новой генетической линии B.1.1.7<sup>4</sup>, характеризующейся необычно большим количеством отличий в S-белке от референсной последовательности и кроме нее содержащей еще две важных мутации – делецию двух аминокислот HV в положениях 69-70 (21765-21770 del), а также замену P681H (C23604A), расположенную рядом с фуриновым сайтом разрезания S-белка на две субъединицы. Причем эти две мутации встречались до этого только по отдельности. Первые случаи выявления данной линии вирусов были зафиксированы во второй половине сентября в Англии, после чего она начала активно распространяться. К концу ноября 2020 г. в этой линии B.1.1.7, продолжавшей эволюционировать, уже существовали три субклады, каждая из которых несла по одной нуклеотидной замене. Другими авторами было показано, что за период с начала сентября по середину ноября циркулирующий в Англии генотип SARS-CoV-2 501Y без делеции двух аминокислот Δ69/Δ70 оказался приблизительно на 10% более трансмиссивным, чем вариант 501N, тогда как вариант 501Y с делецией этих аминокислот в тот же период уже превышал исходный вариант 501N на 70-80% [Leung et al., 2021]. Причиной этого может быть то, что у новых вариантов происходит лучшее взаимодействие их RBD доменов с ACE2 рецептором. По данным Агентства Public Health England, в период с 1 октября 2020 г. по 31 марта 2021 г. инфицирование людей вариантом B.1.1.7 (VOC-20DEC-01) в Великобритании составило 99,37% от всех случаев.

В конце 2020 г. в Англию из Южной Африки проник схожий южноафриканский вариант вируса, отнесенный к линии B.1.351 (501Y.V2 или VOC-20DEC-02) [Tang et al., 2021]. Недавно сообщено, что коронавирус линии B.1.351 образует более тесную связь с рецептором ACE2 и тем самым не подвергается

нейтрализации специальными моноклональными антителами [Zhou et al., 2021], а также плазмой переболевших доноров [Wibmer et al., 2021], что делает этот вариант вируса более опасным, чем остальные. Но эти сведения нельзя считать исключительно верными, поскольку в другой работе подтверждена кросс-реактивность антител этого варианта с вирусами первой волны [Moyo-Gwete et al., 2021]. Близкий к этой группе штаммов новый высоко трансмиссивный генотип, обозначенный как P.1 (501Y.V3 или B.1.1.28 или VOC-21-JAN-02), в январе 2021 г. был выявлен у четырех туристов из Бразилии, прибывших в Японию [Mahase, 2021]. Этот вариант несет четыре синонимичных мутации, 17 уникальных замен аминокислот, три делеции и одну четырехнуклеотидную вставку. Чуть позже этот вариант вируса добрался до Италии, а в Бразилии нашли его «продолжение» в виде P.2 (B.1.1.33 или VUI-21JAN-01) [Maggi et al., 2021]. В конце января 2021 г. SARS-CoV-2 линии P.1 выявлен также в Германии и Южной Кореи [Singh et al., 2021].

Весьма важным вопросом является изменение поведения нового коронавируса в результате происходящих мутаций. Известно, что большинство вирусов млекопитающих, в том числе вирусы с (+)-цепью в виде линейной одноцепочечной РНК (как и SARS-CoV-2) подвержены мутациям с целью мимикрии под хозяйское соотношение CpG динуклеотидов [Cheng et al., 2013]. Предполагается, что снижение количества CpG динуклеотидов разными вирусами предпринимается для ухода от воздействия на них антивирусного белка «цинковых пальцев» хозяина, способствующего разрушению вирусной РНК именно в этих участках. Проведенный анализ секвенированных геномов SARS-CoV-2 показал, что этот вирус имеет наименьшее содержание CpG динуклеотидов, что, возможно, обеспечивает ему лучшую защиту внутри клеток человека [Xia, 2020; Subramanian, 2021]. При этом другими авторами обнаружено, что такое «истощение» CpG динуклеотидов в геноме происходит неравномерно [Digard et al., 2020]. Так, гены E белка и ORF10 демонстрируют отсутствие CpG супрессии. Сравнение динуклеотидов CpG в кодонах геномов SARS-CoV-2 и прочих коронавирусов, наглядно продемонстрировало то, что действительно имеет место некоторое «освобождение» от таковых у нового коронавируса [Chen et al., 2021]. Так, этими авторами показано, что для кодирования тех аминокислот, у которых за счет вырожденности генетического кода имеется выбор кодонов, содержащих во втором и третьем положениях CpG динуклеотиды, SARS-CoV-2 в большинстве случаев «выбирает» иные кодоны. Чтобы не быть голословными приведем фрагмент подготовленной в цитируемой работе таблицы, ограничившись лишь крайними значениями и небольшим числом коронавирусов (табл. 1).

<sup>4</sup> Всего линия B.1.1.7 несет шесть синонимичных замен нуклеотидов, 14 несинонимичных замен (одна из которых приводит к образованию стоп-кодона) и три делеции из одной, двух и трех аминокислот, причем только в одном S-белке из них находится шесть несинонимичных замен и две делеции.

Таблица 1. Избирательность кодирования отдельных аминокислот некоторыми коронавирусами\*  
Table 1 - Selectivity of encoding of several amino acids by some coronaviruses\*

Аминокислота Amino acid	Кодон Codon**	SARS-CoV-2	SARS-CoV	MERS-CoV	HCoV-OC43
Alanine	GCG	0.16	0.24	0.26	0.20
	GCT***	2.19	2.08	2.10	2.10
Arginine	AGA	2.64	2.08	1.33	1.88
	CGG	0.20	0.11	0.43	0.32
Proline	CCG	0.14	0.14	0.16	0.21
	CCT	1.92	1.77	2.00	2.02
Serine	TCG	0.11	0.20	0.17	0.15
	TCT	2.00	1.99	2.11	1.84
Threonine	ACG	0.19	0.17	0.19	0.09
	ACT	1.77	1.70	1.96	1.99

\* - количественные данные частично взяты из статьи Chen et al. [2021]

\* - the quantitative data is partly taken from the article by Chen et al. [2021]

\*\* - приведены только кодоны с крайними значениями их использования коронавирусами

\*\* - only codons with extreme values of their use by coronaviruses are given

\*\*\* - во избежание недоразумений следует заметить, что кодоны, непосредственно кодирующие аминокислоты, представлены цепями РНК с урацилами, однако в молекулярной биологии принято преимущественно оперировать последовательностями ДНК с тиминами.

\*\*\* - to avoid misunderstandings, it should be noted that the codons that directly encode amino acids are represented by RNA chains, but in molecular biology, it is generally accepted to operate with DNA sequences.

Что касается влияния конкретных миссенс-мутаций на поведение SARS-CoV-2, то стоит обратиться к двум вариантам вируса - 614G и 501Y, которые оказались не только более инфекционными, но и, по некоторым сведениям, приводили к большему проценту смертельных исходов [Biswas, Mudi, 2020; Davies et al., 2021]. Генетическая линия B.1.1.7 по данным Public Health England обуславливает смертность при заражении ею в Англии 2,3% инфицированных, что также выше значений для некоторых других вариантов, однако появившаяся в феврале 2021 г. линия B.1.525 (VUI-21FEB-03), распространяющаяся не так интенсивно, по данным того же Агентства обеспечивает смертность на уровне 4,3%. Фатальность D614G мутации была показана на примере ряда стран Европы с высоким уровнем смертельных исходов от COVID-19 [Eaaswarkhanth et al., 2020]. Однако имеются и другие сведения, что ни 614G, ни 501Y мутации не оказывают заметного влияния на тяжесть течения болезни [Erol, 2020]. В этой же статье автор прямо в заголовке задается вопросом – являются ли мутации SARS-CoV-2 «друзьями» или врагами (friend - foe) человека в том смысле, что они способны ослабить свое воздействие на хозяина, и в итоге приходит к выводу, что, несмотря на большую трансмиссивность 614G и 501Y вариантов коронавируса, конформации их S-белков возможно оказываются более уязвимыми для воздействия антител. Также в этой статье отмечается, что нельзя исключать возникновение мутации 501D, присущей коронавирусу летучих мышей RaTG13, как считается послужившим одним из предков SARS-CoV-2 и за счет этого имеющего меньшее сродство к ACE2 рецептору человека. Безусловно, исключать такую реверс-мутацию в геноме вируса нельзя, но она, скорее всего, останется незаметной, поскольку данный вариант вируса будет

плохо или вообще не будет инфицировать человека и распространения соответственно не получит. Здесь можно еще заметить, что другая мутация в 501 положении S-белка (N501T) была обнаружена в Италии еще в августе 2020 г. [Fiorentini et al., 2021]. Тот изолят нес еще ряд мутаций, среди которых внимание привлекает мутация Q493K, также локализованная в RBD домене. Но эта работа итальянских ученых даже более интересна другим, поскольку в ней говорится о персистенции SARS-CoV-2, и поэтому мы к ней еще вернемся.

Из почти двух тысяч полных геномов SARS-CoV-2, выделенных и секвенированных в Российской Федерации к концу 2020 г., нами случайным образом из базы данных (<https://bigd.big.ac.cn/ncov?lang=en>) были отобраны 400 геномов (по 100 в каждом из четырех кварталов 2020 г.) и проанализированы на предмет изменчивости циркулирующих штаммов. Безусловно, эта информация не может считаться исчерпывающей, поскольку, во-первых, взяты не все секвенированные изоляты, а только их пятая часть. Но главное в другом – позволяет ли это количество обеспечить в целом репрезентативность выборки от общего неизвестного числа циркулирующих в России штаммов, носителями которых являлись и являются около 4 млн. человек. Притом, что в той же Англии с приблизительно таким же числом заболевших COVID-19 секвенировано в 100 раз больше полных геномов SARS-CoV-2, результатом чего является и обнаружение ими значительно большего количества разных мутаций, что опять-таки подтверждает принцип перехода количества в качество. Тем не менее, некоторое представление о циркулирующих на территории России штаммов нового коронавируса проведенный нами анализ все же дает.

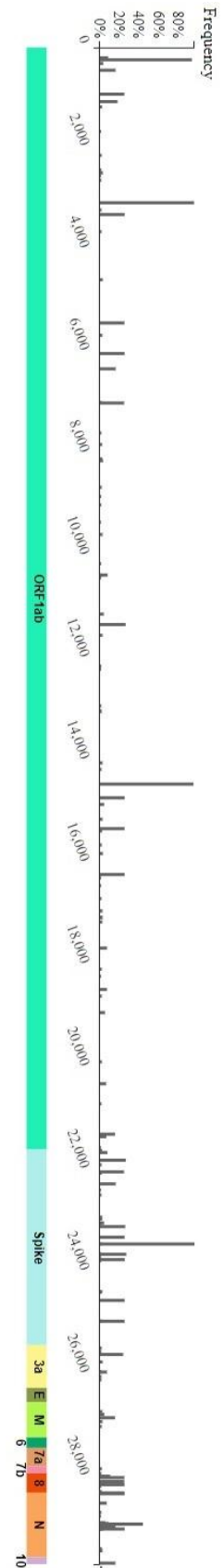


Рис. 5. Произшедшие мутации вирусного генома SARS-CoV-2 во всем мире по состоянию на конец марта 2021 г. (<https://covid-miner.ito.gov.it/app/variants>)

Fig. 5. SARS-CoV-2 viral genome mutations worldwide as of the end of March 2021 (<https://covid-miner.ito.gov.it/app/variants>)

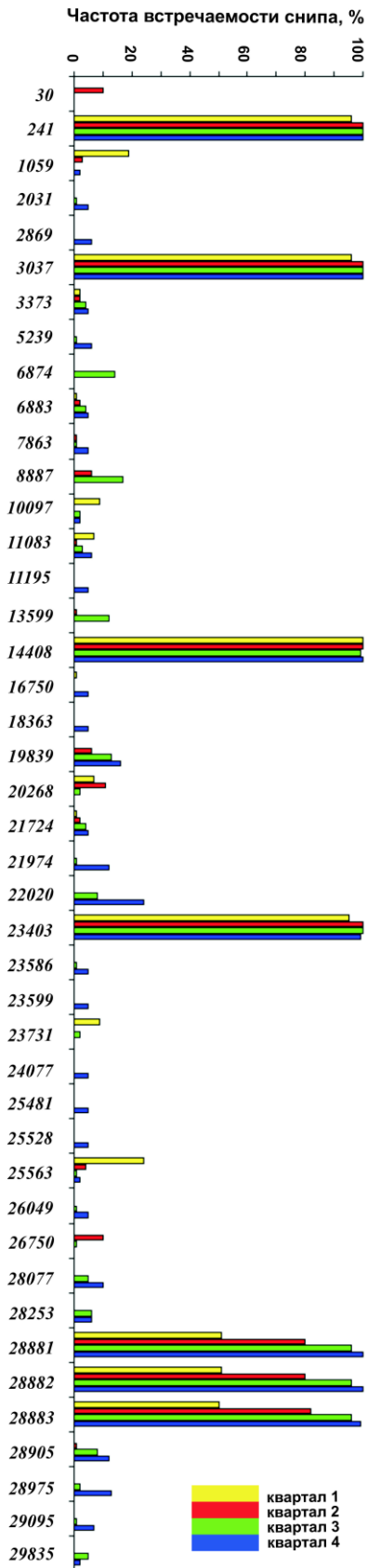


Рис. 4. Динамика встречаемости SNP в полных геномах SARS-CoV-2 (по 100 изолятов в квартал), выделенных и секвенированных на территории Российской Федерации в разные кварталы 2020 г.

Fig. 4. Dynamics of the occurrence of SNPs in the complete SARS-CoV-2 genomes (100 per quarter) isolated and sequenced in the Russian Federation in different quarters of 2020

Так, из рис. 4 можно видеть, что у отобранных на территории РФ изолятов присутствуют семь мажорных мутаций в положениях C241T (5'UTR), C3037T (NSP3, *не приводит к замене аминокислоты*), C14408T (NSP12b), A23403G (S), G28881A (N), G28882A (N) и G28883C (N) референсного генома. При этом первые четыре из них встречались в массовом количестве на протяжении всего года, тогда как три последних показывают динамику роста их встречаемости, достигшую почти максимума в третьем и четвертом кварталах 2020 г. Еще ряд мутаций достигли величины около 15-20% от референсной последовательности, что также следует принимать во внимание при подборе праймеров и гибридизационных зондов для детекции SARS-CoV-2 на территории России с помощью ОТ-ПЦР или иных реакций амплификации нуклеиновых кислот. Однако можно видеть, что две из них (несинонимичные - C1059T|T265Y и G25563T|Q57H) практически сошли на нет в третьем квартале, лишь изредка объявляясь в четвертом. При этом нельзя не заметить появление в четвертом квартале сразу целого ряда новых мутаций, большинство из которых

несинонимичны: A2031G (ORF1a/nsp2 - D589G/D409G), C11195T (ORF1a/nsp6 - L3644F/L75F), C16750T (ORF1ab/nsp13 - P5496S/P172S), G21974T (S - D138H), A23586G (S - Q675R), T23599A (S - N679K), G24077T (S - D839Y), G25481A (ORF3a - R30H), C25528A (ORF3a - L46I), G26049T (ORF3a - L219F), и неизвестно, как они поведут себя в дальнейшем.

На рис. 5 приведено распределение мутаций в геноме SARS-CoV-2 в мире, включая Россию, по состоянию на конец марта 2021 г., из которого видно, что есть некоторые отличия по частотам встречаемости некоторых мутаций. Так, в частности видно, что мутации в положениях 28881 - 28883 в России встречаются значительно чаще. Всего для коронавирусного генома в настоящее время выявлено 158 мутаций, частоты которых составляют 1% и более (<https://covid-miner.ifo.gov.it/app/variants>). В таблице 2 приведены мажорные мутации, встречаемость которых в геноме SARS-CoV-2 в мире 25% и более. При этом четыре из них встретились в более чем 90% секвенированных изолятов.

Таблица 2.

Частоты встречаемости мажорных мутаций в геноме коронавируса SARS-CoV-2 в мире по сравнению с референсной (Reference) последовательностью по состоянию на конец марта 2021 г.

Table 2. - The frequency of major mutations in the SARS-CoV-2 coronavirus genome in the world compared to the reference sequence as of the end of March 2021

Gene	Position	Mutation	Type	Reference	Alt	Frequency
Spike	23403	D614G	missense_variant	A	G	96.5%
ORF1ab	3037	F924F	synonymous_variant	C	T	96.0%
ORF1ab	14408	P4715L	missense_variant	C	T	95.5%
ORF1ab	241	-	upstream_gene_variant	C	T	93.8%
N	28881	R203K	missense_variant	G	A	43.8%
N	28882	R203R	synonymous_variant	G	A	43.7%
N	28883	G204R	missense_variant	G	C	43.7%
Spike	23604	P681H	missense_variant	C	A	26.9%
Spike	21764	H69_Val70del	disruptive_inframe_deletion	ATACATG	A	26.5%
ORF1ab	11287	S3675_Phe3677del	conservative_inframe_deletion	GTCTGGTTTT	G	26.2%
Spike	23063	N501Y	missense_variant	A	T	25.8%
Spike	23709	T716I	missense_variant	C	T	25.3%
ORF1ab	3267	T1001I	missense_variant	C	T	25.3%
ORF1ab	14676	P4804P	synonymous_variant	C	T	25.2%
N	28977	S235F	missense_variant	C	T	25.2%
ORF1ab	16176	T5304T	synonymous_variant	T	C	25.2%
ORF1ab	5986	F1907F	synonymous_variant	C	T	25.2%
Spike	23271	A570D	missense_variant	C	A	25.2%
Spike	24506	S982A	missense_variant	T	G	25.1%
ORF1ab	15279	H5005H	synonymous_variant	C	T	25.1%
Spike	24914	D1118H	missense_variant	G	C	25.1%
ORF8	28111	Y73C	missense_variant	A	G	25.1%
N	28282	D3E	missense_variant	T	A	25.0%
ORF1ab	5388	A1708D	missense_variant	C	A	25.0%
N	28281	D3V	missense_variant	A	T	25.0%
N	28280	D3H	missense_variant	G	C	25.0%

Из таблицы 2 можно видеть целый ряд синонимичных мажорных мутаций с частотами от 25,0 до 43,7%. При этом наибольшее удивление вызывает мутация в положении 3037 ORF1ab, которая не приводит к замене аминокислоты, но в силу каких-то возможно других особенностей получившая широчайшее распространение (96%), в том числе и в России.

Ранее отечественными авторами опубликованы две статьи, в которых проведен подробный анализ циркулирующих вариантов коронавируса на территории России и собранных в марте - апреле 2020 г., геномы которых были ими секвенированы. В первой работе [Kozlovskaya et al., 2020] отмечается, что в дополнение к часто встречающейся в России комбинации мутаций C241T, C3037T, C14408T, A23403G, характерных для 213 из 218 секвенированных изолятов, было обнаружено три дополнительных – G28881A, G28882A, G28883C, что оказалось присуще 144 изолятам из тех же 218. В работе других авторов [Komissarov et al., 2021] сообщается о секвенировании ими 135 геномов SARS-CoV-2 и дополнительно взятых в анализ секвенированных другими авторами еще 76 геномах изолятов коронавирусов, собранных на территории Российской Федерации. При этом показано, что в тот период в России циркулировали штаммы большей частью европейского происхождения (не из Китая, границы с которым были на тот момент закрыты), относящиеся к генетическим линиям B.1, B.1.1, B.1.1.x по Rango номенклатуре или G, GR, GH соответственно по номенклатуре GISAID.

Согласно Аналитической справке, подготовленной Российским консорциумом по секвенированию геномов коронавирусов (<https://corgi.center>), в настоящее время на территории Российской Федерации доминируют вирусы SARS-CoV-2 из клады GR, представленной генетическими линиями B.1.1.x, различных производных которых зафиксировано более 70, однако большая их часть представлена единичными изолятами. В целом отмечается, что для России характерна невысокая изменчивость нового коронавируса.

#### **Персистенция SARS-CoV-2 в организме человека, реинфекция или реактивация вируса при повторных случаях заражения**

Ранее нами [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2020] уже было уделено внимание длительной персистенции коронавируса в организме многих людей, среди которых выделялся пожилой японец, у которого после полного выздоровления на 111-ый день с помощью ОТ-ПЦР все еще обнаруживался коронавирус, хотя и в небольшом количестве, которого, впрочем, было достаточно, чтобы

инфицировать культуру клеток Vero E6. Эти данные свидетельствуют о том, что в пациенте находились полноценные вирионы, несмотря на наличие у данного человека нейтрализующих антител, возможно, не позволявших вирусу активно размножаться и соответственно не проявлять болезненные симптомы [Abe et al., 2020]. И это далеко не единственный случай длительного нахождения нового коронавируса в человеке. Так, один выздоровевший от тяжелого течения COVID-19 получил положительный результат на вирусную РНК SARS-CoV-2 через 87 дней после первого положительного теста [Turner et al., 2021]. Причем у него не было никакого связанного с этим повышения титров антител к S-белку, что свидетельствовало против повторного заражения. Наблюдение за 38 больными COVID-19 пожилого возраста с легким течением болезни в Китае показало, что у них долго (до 118 дней в максимуме) отмечался положительный ПЦР-тест на коронавирус из мокроты, при этом уровни IgM и IgG антител у них не отличались от обычных случаев относительно быстрого выздоровления [Li et al., 2020]. Секвенирование полных геномов из взятых у них изолятов в марте-апреле 2020 г. позволило заключить, что штаммы SARS-CoV-2 соответствовали тем, что циркулировали в январе-феврале 2020 г., что отчасти снимало вопрос о произошедшей у них реинфекции, но не сняло вопрос о длительности персистенции вообще.

В одном из недавних обзоров [Dao et al., 2021] приведена большая подборка случаев, когда выздоровевшие люди, дважды показавшие отрицательный результат ПЦР-теста, через некоторое время (иногда довольно продолжительное) становились репозитивными; при этом возраст значения практически не имел, поскольку в этой когорте были люди от младенцев до 91-летних старцев. Здесь вполне уместно задаться вопросом - а были ли их отрицательные тесты полностью достоверными? Ложноотрицательные результаты ПЦР-тестов на коронавирус могут иметь различные причины, среди которых преимущественно технические ошибки, совершаемые на преаналитическом этапе, а также мажорные мутации новых вариантов вируса, приходящиеся на места отжига праймеров и гибридизационных зондов. Но не менее важной причиной может быть принципиальное отсутствие вирусного материала во взятом мазке. Подсчитано, что у болеющего человека только одна клетка из  $10^5 - 10^7$  может быть инфицирована SARS-CoV-2, что определяет тяжелую и легкую форму течения болезни соответственно [Sender et al., 2020]. При взятии мазка на него попадает около  $10^6$  эпителиальных клеток, и таким образом нет гарантии, что в каждом мазке будет присутствовать вирус, и

соответственно, положительному сигналу на коронавирус, взяты просто неоткуда. При выздоровлении пропорция здоровых клеток явно увеличивается и может оказаться, что зараженной вирусом будет только одна из  $10^8$  или даже из  $10^9$  клеток, и вероятность того, что именно такая клетка будет взята для выделения из нее РНК для анализа стремится к нулю. Но иногда клетка с вирусом все же может попасть в мазок или в иной анализируемый образец, и с учетом того, что в ней содержится до  $10^4$  -  $10^5$  вирусных частиц (по крайней мере, их может быть столько при острой фазе болезни), этого или даже меньшего количества теоретически может хватить для детекции SARS-CoV-2 с помощью ОТ-ПЦР. Поэтому в литературе можно встретить очень разнородные сведения о нахождении или не нахождении вирусной РНК с помощью ОТ-ПЦР или других реакций амплификации в различные сроки от момента манифестации заболевания. И это также одна из загадок нового коронавируса - как долго он может пребывать в организме человека, в том числе вероятно в латентном состоянии, и получить на нее ответ пока, к сожалению, невозможно. Здесь еще нужно вспомнить, что в организме почти каждого индивида постоянно присутствует множество разных вирусов, среди которых самый известный – вирус простого герпеса (HSV-1), «пробуждению» которого способствуют переохлаждение, снижение сопротивляемости организма, ослабление иммунитета. Для детекции HSV-1 в организме человека (не в острую фазу) уже давно предложено применять так называемую вложенную ПЦР, заметно увеличивающую чувствительность этого метода [Cantin et al., 1991]. Другие авторы с помощью ПЦР в реальном времени решили выяснить, где у человека находится резервуар пребывания в латентном состоянии HSV-1, а также других герпетических вирусов, для чего у умерших людей (от других причин) брали биоптаты очень большого числа разных тканей и выявили, что HSV-1 обнаруживается преимущественно в нервной ткани [Chen, Hudnall, 2006]. Поскольку про новый коронавирус мы еще очень мало знаем, то исключать, что у некоторых людей он может сохраняться в организме весьма длительное время, никак себя не проявляя, нельзя. Соответственно, и резервуар для нахождения SARS-CoV-2 в латентном состоянии нужно искать отдельно и тщательно.

Не менее важно знать – будет ли носитель латентного коронавируса являться распространителем инфекции? К сожалению, до сих пор неизвестно, какое количество вирусных частиц должно попасть в среднем на слизистую человека, чтобы вызвать у него клинические симптомы. К тому же, это видимо зависит, помимо самого человека, еще и от

конкретного штамма коронавируса, поскольку, как показали последние месяцы, британский штамм 501Y.V1 обладает увеличенной контагиозностью и ему вероятно достаточно меньшего количества вирионов для инфицирования. В этой связи возникает вопрос относительно возможности стать распространителем коронавируса человеку, получившему прививку, но подвергнувшемуся вирусной атаке и переносящему заболевание в бессимптомной форме. Что касается вакцин, то, как известно, они защищают не всех в равной степени в силу индивидуальных особенностей людей. При этом также крайне важно знать, какое время в организме держатся антитела с титром, обеспечивающим защиту, и каков этот титр на самом деле<sup>5</sup>. В этой связи вопрос о реактивации SARS-CoV-2 или реинфекции остается по-прежнему актуальным, и ему в последние месяцы стали уделять гораздо больше внимания.

О первом подтвержденном случае реинфекции новым коронавирусом, произошедшим в Гонконге, было сообщено в конце августа 2020 г. после того, как было проведено сравнение нуклеотидных последовательностей полных геномов изолятов SARS-CoV-2, взятых у пациента при первом заболевании и при произошедшей через 142 дня вторичной инфекции [To et al., 2020]. Оказалось, что эти вирусы несут довольно много замен и относятся к разным кладам/линиям, циркулировавшим, согласно базе данных GISAID, в марте-апреле и июле-августе 2020 г. соответственно, что однозначно свидетельствует о реинфекции, поскольку большое число замен вряд ли может образоваться при персистенции вируса в организме человека. К настоящему времени уже имеется немало сообщений, в которых приводится информация о реинфекциях, подтвержденных с помощью полногеномного секвенирования изолятов SARS-CoV-2, взятых во время первого и второго заболеваний. Так, сравнение нуклеотидных последовательностей изолятов вируса, взятых у пациента из штата Невада в марте и июне 2020 г. показало для первого четыре отличия от референсного штамма SARS-CoV-2, а для второго – семь отличий, при этом ни одно из них не совпало, что дает все основания считать данный случай реинфекцией [Tillet et al., 2020]. В Бельгии у 51-летней женщины в результате секвенирования образцов, взятых 9 марта и 10 июня 2020 г., было обнаружено между ними 11 отличий, позволивших решить, что первый изолят относится к линии коронавируса B.1.1, тогда как второй - к линии A [van Eslande et al., 2021].

<sup>5</sup> Помимо антител, еще имеется Т-клеточный иммунитет, но его детектирование крайне затруднительно, и носить массовый характер оно не может.

Здесь можно еще добавить, что при отборе тех проб для секвенирования в марте Сt при амплификации фрагмента гена нуклеокапсидного белка N составил 25–27, тогда как в июне – 32–33. В статье, подготовленной в начале ноября 2020 г., посвященной также реинфекции SARS-CoV-2, упоминается о 13 ранее опубликованных случаях повторного заражения новым штаммом коронавируса, имевших место в разных странах [Colson et al., 2021], которые мы здесь опускаем. Описывая свой случай, эти авторы сообщают, что их пациент, проживающий в Марселе (Франция), был инфицирован первый раз в апреле 2020 г., а второй раз четыре месяца спустя, и это были штаммы, относящиеся к разным генетическим линиям/кладам, циркулировавшим в те периоды. Еще больший промежуток времени между двумя инфекциями в 185 дней удалось зафиксировать также в Бельгии, но другой группой авторов, которые, просеквенировав соответствующие изоляты, нашли между ними 18 отличий, свидетельствующих, что эти коронавирусы относились к разнымкладам [Selhorst et al., 2021].

Но в литературе можно встретить и не столь очевидные случаи реинфекции. Так, в одной из статей в заголовке вынесена проблема – реинфекция или реактивация SARS-CoV-2 [Salehi-Vaziri et al., 2021]. В данной публикации подписи к рисункам, к сожалению, несколько отличаются от текста в самих рисунках, но, тем не менее, можно сделать вывод, что изоляты SARS-CoV-2, взятые с разницей в 156 дней, после секвенирования небольших фрагментов S- и N-белков (не всего генома коронавируса) позволили выявить лишь одно отличие от референсной последовательности, что все же позволяет с большей вероятностью допустить действительно реактивацию коронавируса, пребывавшего в латентном состоянии. Возвращаясь к ранее цитированной работе итальянских авторов, нашедших у SARS-CoV-2 мутацию N501T [Fiorentini et al., 2021], следует заметить, что у одного и того же человека ими были отобраны изоляты в августе и ноябре 2020 г., секвенирование полных геномов которых позволило выявить между ними всего три отличия при том, что они относятся к одной линии B.1.1, что не исключает ни реинфекцию, ни реактивацию вируса.

То, что реинфекция вирусом SARS-CoV-2 возможна, сомнений уже не остается, что касается возможной реактивации коронавируса, перешедшего в латентное состояние, то для того, чтобы уверенно ответить на этот вопрос, нужны дополнительные исследования.

### Заключение

Несмотря на наличие у коронавирусов редактирующей активности, SARS-CoV-2 постоянно

мутирует и образующиеся в нем как в квазивиде интрахозяйские iSNV, переходя к другому человеку, подтверждают имеющую место интерхозяйскую изменчивость. Они способны превратиться через минорные мутации в их мажорные варианты, свидетельствующие о получении коронавирусом за их счет определенных преимуществ при распространении инфекции. Какова же будет тяжесть вызываемого ими COVID-19 и возможность таким вариантам вируса уклоняться от действия антител, выработавшихся или в ходе болезни, или в результате вакцинации, предсказать трудно. К тому же персистенция SARS-CoV-2 в организме человека (по крайней мере, у некоторых индивидов) явно может продолжаться довольно долго, да и случаи реинфекции, в том числе другим штаммом коронавируса уже не редкость. Поэтому как переболевшим, так и вакцинированным людям следует предпринимать меры предосторожности, в том числе в виде ношения масок, которые все же защищают от попадания вируса на поверхности слизистых, тем более, если вирусные частицы присутствуют в воздухе в относительно небольших количествах.

Таким образом, соблюдение социальной дистанции, а также ношение масок с должным уровнем защиты (медицинских), вкпе с увеличением числа вакцинированных и перенесших болезнь бессимптомно или с проявлением симптомов COVID-19 и формирующих таким образом коллективный иммунитет, могут со временем обеспечить для всего человечества перевод этой опасной инфекции в разряд сезонных. Еще одним важным моментом от ношения масок на фоне новой коронавирусной инфекции стало значительное снижение прочих вирусных заболеваний, передающихся воздушно-капельным путем, что на здоровье населения безусловно сказывается положительно. Будем здоровы!

### Литература

1. Гарафутдинов Р.Р., Мавзютов А.Р., Алексеев Я.И., Воробьев А.А., Никоноров Ю.М., Чубукова О.В., Матниязов Р.Т., Баймиев Ан.Х., Максимов И.В., Кулуев Б.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Бетакоронавирусы человека и их высокочувствительная детекция с помощью ПЦР и прочих методов амплификации // *Biomics*. 2020. Т.12(1). С. 121-179. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-7
2. Гарафутдинов Р.Р., Мавзютов А.Р., Никоноров Ю.М., Чубукова О.В., Матниязов Р.Т., Баймиев Ан.Х., Максимов И.В., Мифтахов И.Ю., Халикова Е.Ю., Кулуев Б.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Бетакоронавирус SARS-CoV-2, его геном, разнообразие генотипов и молекулярно-

- биологические меры борьбы с ним // *Biomics*. 2020. T.12(2). С. 242-271. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-15
3. Мавзютов А.П., Гарафутдинов Р.Р., Халикова Е.Ю., Юлдашев Р.А., Хусаинова Р.И., Чубукова О.В., Гималов Ф.Р., Матниязов Р.Т., Алексеев Я.И., Воробьев А.А., Вершинина З.Р., Мифтахов И.Ю., Никоноров Ю.М., Максимов И.В., Кулуев Б.Р., Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Проблемные аспекты диагностики коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 с помощью обратнo-транскрипционной ПЦР // *Biomics*. 2020. T.12(4). С. 564-590. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-50
  4. Alvarez-Moreno CA, Rodríguez-Morales AJ. Testing Dilemmas: Post negative, positive SARS-CoV-2 RT-PCR - is it a reinfection? // *Travel Med Infect Dis*. 2020. V.35. P.101743. doi: 10.1016/j.tmaid.2020.101743
  5. Armero A., Berthet N., Avarre J.C. Intra-Host Diversity of SARS-Cov-2 Should Not Be Neglected: Case of the State of Victoria, Australia // *Viruses*. 2021. V. 13(1). P. 133. doi: 10.3390/v13010133
  6. Baric R.S. Emergence of a Highly Fit SARS-CoV-2 Variant // *N Engl J Med*. 2020. V. 383(27). P. 2684-2686. doi: 10.1056/NEJMcibr2032888
  7. Bendall M.L., Gibson K.M., Steiner M.C., Rentia U., Pérez-Losada M., Crandall K.A. HAPHIPE: Haplotype Reconstruction and Phylodynamics for Deep Sequencing of Intra-Host Viral Populations // *Mol. Biol. Evol*. 2020. msaa315. doi: 10.1093/molbev/msaa315
  8. Biswas S.K., Mudi S.R. Spike protein D614G and RdRp P323L: the SARS-CoV-2 mutations associated with severity of COVID-19 // *Genomics Inform*. 2020. V. 18(4). e44. doi: 10.5808/GI.2020.18.4.e44
  9. Cantin E.M., Lange W., Openshaw H. Application of polymerase chain reaction assays to studies of herpes simplex virus latency // *Intervirology*. 1991. V. 32(2). P. 93-100. doi: 10.1159/000150189
  10. Cella E, Benedetti F, Fabris S, Borsetti A, Pezzuto A, Ciotti M, Pascarella S, Ceccarelli G, Zella D, Ciccozzi M, Giovanetti M. SARS-CoV-2 Lineages and Sub-Lineages Circulating Worldwide: A Dynamic Overview. // *Chemotherapy*. 2021. V.18. P.1-5. doi: 10.1159/000515340
  11. Chen T., Hudnall S.D. Anatomical mapping of human herpesvirus reservoirs of infection // *Mod. Pathol*. 2006. 19(5). P. 726-37. doi: 10.1038/modpathol.3800584
  12. Chen Z, Boon SS, Wang MH, Chan RWY, Chan PKS. Genomic and evolutionary comparison between SARS-CoV-2 and other human coronaviruses // *J Virol Methods*. 2021. V.289. P.114032. doi: 10.1016/j.jviromet.2020.114032
  13. Cheng X, Virk N, Chen W, Ji S, Ji S, Sun Y, Wu X. CpG usage in RNA viruses: data and hypotheses // *PLoS One*. 2013. V.8(9). e74109. doi: 10.1371/journal.pone.0074109
  14. Colson P., Finaud M., Levy N., Lagier J.C., Raoult D. Evidence of SARS-CoV-2 re-infection with a different genotype // *J. Infect*. 2021. V. 82(4). P. 84-123. doi: 10.1016/j.jinf.2020.11.011
  15. Dao T.L., Hoang V.T., Gautret P. Recurrence of SARS-CoV-2 viral RNA in recovered COVID-19 patients: a narrative review // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 2021. V. 40(1). P. 13-25. doi: 10.1007/s10096-020-04088-z
  16. Davies N.G., Jarvis C.I.; CMMID COVID-19 Working Group, Edmunds WJ, Jewell NP, Diaz-Ordaz K., Keogh R.H. Increased mortality in community-tested cases of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 // *Nature*. 2021. doi: 10.1038/s41586-021-03426-1
  17. Digard P, Lee HM, Sharp C, Grey F, Gaunt E. Intra-genome variability in the dinucleotide composition of SARS-CoV-2 // *Virus Evol*. 2020. V.6(2). P.veaa057. doi: 10.1093/ve/veaa057
  18. Du P., Song C., Li R., Song Y., Li J., Ding N., Zhang J., Song R., Han J., Gao G., Yue J., Duan A., Huang Y., An J., Wang J., Zhang F., Chen C., Zeng H. Specific re-distribution of SARS-CoV-2 variants in the respiratory system and intestinal tract // *Clin. Infect. Dis*. 2020. ciaa1617. doi: 10.1093/cid/ciaa1617
  19. Erol A. Are the emerging SARS-COV-2 mutations friend or foe? // *Immunol. Lett*. 2021. V. 230. P. 63-64. doi: 10.1016/j.imlet.2020.12.014
  20. Eskier D., Suner A., Oktay Y., Karakulah G. Mutations of SARS-CoV-2 nsp14 exhibit strong association with increased genome-wide mutation load // *Peer J*. 2020. V.8. e10181. doi: 10.7717/peerj.10181
  21. Fiorentini S, Messali S, Zani A, Caccuri F, Giovanetti M, Ciccozzi M, Caruso A. First detection of SARS-CoV-2 spike protein N501 mutation in Italy in August, 2020 // *Lancet Infect Dis*. 2021. S1473-3099(21)00007-4. doi: 10.1016/S1473-3099(21)00007-4
  22. Forster P., Forster L., Renfrew C., Forster M. Phylogenetic network analysis of SARS-CoV-2 genomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020. V.117(17). P. 9241-9243. doi: 10.1073/pnas.2004999117
  23. Freed N.E., Vlková M., Faisal M.B., Silander O.K. Rapid and inexpensive whole-genome sequencing of SARS-CoV-2 using 1200 bp tiled amplicons and Oxford Nanopore Rapid Barcoding // *Biol. Methods Protoc*. 2020. V. 5(1):bpaa014. doi: 10.1093/biomethods/bpaa014
  24. Gibson K.M., Steiner M.C., Rentia U., Bendall M.L., Pérez-Losada M., Crandall K.A. Validation of Variant Assembly Using HAPHIPE with Next-Generation Sequence Data from Viruses // *Viruses*. 2020. V. 12(7). P. 758. doi: 10.3390/v12070758
  25. Gohl D.M., Garbe J., Grady P., Daniel J., Watson R.H.B., Auch B., Nelson A., Yohe S., Beckman K.B. A rapid, cost-effective tailed amplicon method for sequencing SARS-CoV-2 // *BMC Genomics*. 2020. V. 21(1). P. 863. doi: 10.1186/s12864-020-07283-6

26. Grubaugh N.D., Gangavarapu K., Quick J., Matteson N.L., De Jesus J.G., Main B.J., Tan A.L., Paul L.M., Brackney D.E., Grewal S., Gurfield N., Van Rompay K.K.A., Isern S., Michael S.F., Coffey L.L., Loman N.J., Andersen K.G. An amplicon-based sequencing framework for accurately measuring intrahost virus diversity using PrimalSeq and iVar // *Genome Biol.* 2019. V. 20(1). P. 8. doi: 10.1186/s13059-018-1618-7
27. Itokawa K., Sekizuka T., Hashino M., Tanaka R., Kuroda M. Disentangling primer interactions improves SARS-CoV-2 genome sequencing by multiplex tiling PCR // *PLoS One.* 2020. V. 15(9). e0239403. doi: 10.1371/journal.pone.0239403
28. Itokawa K., Sekizuka T., Hashino M., Tanaka R., Kuroda M. Disentangling primer interactions improves SARS-Cov-2 genome sequencing by the ARTIC Networks multiplex PCR // *bioRxiv.* 2020.03.10.985150. doi.org/10.1101/2020.03.10.985150
29. Jackson C.B., Zhang L., Farzan M., Choe H. Functional importance of the D614G mutation in the SARS-CoV-2 spike protein // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2021. V. 538. P. 108-115. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.11.026
30. Jaworski E., Langsjoen R.M., Judy B., Newman P., Plante J.A., Plante K.S., Miller A.L., Zhou Y., Swetnam D., Dong J., Ren P., Pyles R.B., Ksiazek T., Menachery V.D., Weaver S.C., Routh A. Tiled-ClickSeq for targeted sequencing of complete coronavirus genomes with simultaneous capture of RNA recombination and minority variants // *bioRxiv.* 2021. 2021.03.10.434828. doi: 10.1101/2021.03.10.434828
31. Kannan S.R., Spratt A.N., Quinn T.P., Heng X., Lorson C.L., Sönnnerborg A., Byrareddy S.N., Singh K. Infectivity of SARS-CoV-2: there Is Something More than D614G? // *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2020. V. 15(4). P. 574-577. doi: 10.1007/s11481-020-09954-3
32. Kim D., Lee J.Y., Yang J.S., Kim J.W., Kim V.N., Chang H. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome // *Cell.* 2020. V. 181(4). P. 914-921. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.011
33. Komissarov AB, Safina KR, Garushyants SK, Fadeev AV, Sergeeva MV, Ivanova AA, Danilenko DM, Lioznov D, Shneider OV, Shvyrev N, Spirin V, Glyzin D, Shchur V, Bazykin GA. Genomic epidemiology of the early stages of the SARS-CoV-2 outbreak in Russia // *Nat Commun.* 2021. V.12(1). P.649. doi: 10.1038/s41467-020-20880-z
34. Kozlovskaya L, Pinaeva A, Ignatyev G, Selivanov A, Shishova A, Kovpak A, Gordeychuk I, Ivin Y, Berestovskaya A, Prokhortchouk E, Protsenko D, Rychev M, Ishmukhametov A. Isolation and phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 variants collected in Russia during the COVID-19 outbreak // *Int J Infect Dis.* 2020. V.99. P.40-46. doi: 10.1016/j.ijid.2020.07.024
35. Lauring A.S., Andino R. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses // *PLoS Pathog.* 2010. V. 6(7). e1001005. doi: 10.1371/journal.ppat.1001005
36. Leung K., Shum M.H., Leung G.M., Lam T.T., Wu J.T. Early transmissibility assessment of the N501Y mutant strains of SARS-CoV-2 in the United Kingdom, October to November 2020 // *Euro Surveill.* 2021. V. 26(1). 2002106. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.26.1.2002106.
37. Li Q., Zheng X.S., Shen X.R., Si H.R., Wang X., Wang Q., Li B., Zhang W., Zhu Y., Jiang R.D., Zhao K., Wang H., Shi Z.L., Zhang H.L., Du R.H., Zhou P. Prolonged shedding of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in patients with COVID-19 // *Emerg. Microbes Infect.* 2020. V. 9(1). P. 2571-2577. doi: 10.1080/22221751.2020.1852058
38. Maggi F., Novazzi F., Genoni A., Baj A., Spezia P.G., Focosi D., Zago C., Colombo A., Cassani G., Pasciuta R., Tamborini A., Rossi A., Prestia M., Capuano R., Azzi L., Donadini A., Catanoso G., Grossi P.A., Maffioli L., Bonelli G. Imported SARS-CoV-2 Variant P.1 in Traveler Returning from Brazil to Italy // *Emerg. Infect. Dis.* 2021. V. 27(4). P. 1249-1251. doi: 10.3201/eid2704.210183
39. Mahase E. Covid-19: What new variants are emerging and how are they being investigated? // *BMJ.* 2021. V. 18. 372:n158. doi: 10.1136/bmj.n158
40. Maurano M.T., Ramaswami S., Zappile P., Dimartino D., Boytard L., Ribeiro-Dos-Santos A.M., Vulpescu N.A., Westby G., Shen G., Feng X., Hogan M.S., Ragonnet-Cronin M., Geidelberg L., Marier C., Meyn P., Zhang Y., Cadley J., Ordoñez R., Luther R., Huang E., Guzman E., Arguelles-Grande C., Argyropoulos K.V., Black M., Serrano A., Call M.E., Kim M.J., Belovarac B., Gindin T., Lytle A., Pinnell J., Vougiouklakis T., Chen J., Lin L.H., Rapkiewicz A., Raabe V., Samanovic M.I., Jour G., Osman I., Aguero-Rosenfeld M., Mulligan M.J., Volz E.M., Cotzia P., Snuderl M., Heguy A. Sequencing identifies multiple early introductions of SARS-CoV-2 to the New York City region // *Genome Res.* 2020. V. 30(12). P. 1781-1788. doi: 10.1101/gr.266676.120
41. Mostafa H.H., Fissel J.A., Fanelli B., Bergman Y., Gniazdowski V., Dadlani M., Carroll K.C., Colwell R.R., Simmer P.J. Metagenomic Next-Generation Sequencing of Nasopharyngeal Specimens Collected from Confirmed and Suspect COVID-19 Patients // *mBio.* 2020. V. 11(6). e01969-20. doi: 10.1128/mBio.01969-20
42. Motayo B.O., Oluwasemowo O.O., Olusola B.A., Akinduti P.A., Arege O.T., Obafemi Y.D., Faneye A.O., Isibor P.O., Aworunse O.S., Oranusi S.U. Evolution and genetic diversity of SARS-CoV-2 in Africa using whole genome sequences // *Int J Infect Dis.* 2021. V. 103. P. 282-287. doi: 10.1016/j.ijid.2020.11.190
43. Moyo-Gwete T., Madzivhandila M., Makhado Z., Ayres F., Mhlanga D., Oosthuysen B., Lambson B.E.,

- Kgagudi P., Tegally H., Iranzadeh A., Doolabh D., Tyers L., Chinhoyi L.R., Mennen M., Skelm S., Wibmer C.K., Bhiman J.N., Ueckermann V., Rossouw T., Boswell M., de Oliveira T., Williamson C., Burgers W.A., Ntusi N., Morris L., Moore P.L. SARS-CoV-2 501Y.V2 (B.1.351) elicits cross-reactive neutralizing antibodies // *bioRxiv*. 2021 Mar 6:2021.03.06.434193. doi: 10.1101/2021.03.06.434193
44. Paden C.R., Tao Y., Queen K., Zhang J., Li Y., Uehara A., Tong S. Rapid, Sensitive, Full-Genome Sequencing of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 // *Emerg. Infect. Dis.* 2020. V. 26(10). P. 2401-2405. doi: 10.3201/eid2610.201800
45. Pillay S., Giandhari J., Tegally H., Wilkinson E., Chimukangara B., Lessells R., Moosa Y., Mattison S., Gazy I., Fish M., Singh L., Khanyile K.S., San J.E., Fonseca V., Giovanetti M., Alcantara L.C.Jr., de Oliveira T. Whole Genome Sequencing of SARS-CoV-2: Adapting Illumina Protocols for Quick and Accurate Outbreak Investigation during a Pandemic // *Genes (Basel)*. 2020. V. 11(8). P. 949. doi: 10.3390/genes11080949
46. Platto S., Wang Y., Zhou J., Carafoli E. History of the COVID-19 pandemic: Origin, explosion, worldwide spreading // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2021. V. 538. P. 14-23. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.10.087
47. Rambaut A, Holmes EC, O'Toole Á, Hill V, McCrone JT, Ruis C, du Plessis L, Pybus OG. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology // *Nat Microbiol.* 2020. V.5(11). P.1403-1407. doi: 10.1038/s41564-020-0770-5
48. Rambaut A, Holmes EC, O'Toole Á, Hill V, McCrone JT, Ruis C, du Plessis L, Pybus OG. Addendum: A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology // *Nat Microbiol.* 2021. V.6(3).P.415. doi: 10.1038/s41564-021-00872-5
49. Rato S., Golumbeanu M., Telenti A., Ciuffi A. Exploring viral infection using single-cell sequencing // *Virus Res.* 2017. V. 239. P. 55-68. doi: 10.1016/j.virusres.2016.10.016
50. Riggioni C, Comberiat P, Giovannini M, Agache I, Akdis M, Alves-Correia M, Antó JM, Arcolaci A, Azkur AK, Azkur D, Beken B, Boccabella C, Bousquet J, Breiteneder H, Carvalho D, De Las Vecillas L, Diamant Z, Eguiluz-Gracia I, Eiwegger T, Eyerich S, Fokkens W, Gao YD, Hannachi F, Johnston SL, Jutel M, Karavelia A, Klimek L, Moya B, Nadeau KC, O'Hehir R, O'Mahony L, Pfaar O, Sanak M, Schwarze J, Sokolowska M, Torres MJ, van de Veen W, van Zelm MC, Wang Y, Zhang L, Jiménez-Saiz R, Akdis CA. A compendium answering 150 questions on COVID-19 and SARS-CoV-2 // *Allergy*. 2020. V.75(10). P.2503-2541. doi: 10.1111/all.14449
51. Salehi-Vaziri M., Jalali T., Farahmand B., Fotouhi F., Banifazl M., Pouriayevali M.H., Sadat Larijani M., Afzali N., Ramezani A. Clinical characteristics of SARS-CoV-2 by re-infection vs. reactivation: a case series from Iran // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2021. V. 18. P. 1–7. doi: 10.1007/s10096-021-04221-6
52. Sapoval N., Mahmoud M., Jochum M.D., Liu Y., Elworth R.A.L., Wang Q., Albin D., Ogilvie H.A., Lee M.D., Villapol S., Hernandez K.M., Maljkovic Berry I., Foox J., Beheshti A., Ternus K., Aagaard K.M., Posada D., Mason C.E., Sedlazeck F.J., Treangen T.J. SARS-CoV-2 genomic diversity and the implications for qRT-PCR diagnostics and transmission // *Genome Res.* 2021. V. 31(4):635-644. doi: 10.1101/gr.268961.120
53. Selhorst P., Van Ierssel S., Michiels J., Mariën J., Bartholomeeusen K., Dirinck E., Vandamme S., Jansens H., Ariën K.K. Symptomatic SARS-CoV-2 reinfection of a health care worker in a Belgian nosocomial outbreak despite primary neutralizing antibody response // *Clin. Infect. Dis.* 2020. ciaa1850. doi: 10.1093/cid/ciaa1850
54. Sender R, Bar-On YM, Flamholz A, Gleizer S, Bernsthein B, Phillips R, Milo R. The total number and mass of SARS-CoV-2 virions in an infected person // *medRxiv*. 2020. Nov 17;2020.11.16.20232009. doi: 10.1101/2020.11.16.20232009
55. Singh J., Samal J., Kumar V., Sharma J., Agrawal U., Ehtesham N.Z., Sundar D., Rahman S.A., Hira S., Hasnain S.E. Structure-Function Analyses of New SARS-CoV-2 Variants B.1.1.7, B.1.351 and B.1.1.28.1: Clinical, Diagnostic, Therapeutic and Public Health Implications // *Viruses*. 2021. V. 13(3). 439. doi: 10.3390/v13030439
56. Subramanian S. The Long-Term Evolutionary History of Gradual Reduction of CpG Dinucleotides in the SARS-CoV-2 Lineage // *Biology (Basel)*. 2021. V.10(1). P.52. doi: 10.3390/biology10010052
57. Taiaroa G., DanielRawlinson, Featherstone L, Miranda Pitt M., Caly L., Druce J., Purcell D., Harty L., Tran T., Roberts J., Scott N., Catton M., Williamson D., Coin L., Duchene S. Direct RNA sequencing and early evolution of SARS-CoV-2 // *bioRxiv*. 2020. 03.05.976167. doi.org/10.1101/2020.03.05.976167
58. Tang J.W., Toovey O.T.R., Harvey K.N., Hui D.D.S. Introduction of the South African SARS-CoV-2 variant 501Y.V2 into the UK // *J Infect.* 2021. V. 82(4). P. e8–e10. doi: 10.1016/j.jinf.2021.01.007
59. Tillett R.L., Sevinsky J.R., Hartley P.D., Kerwin H., Crawford N., Gorzalski A., Laverdure C., Verma S.C., Rossetto C.C., Jackson D., Farrell M.J., Van Hooser S., Pandori M. Genomic evidence for reinfection with SARS-CoV-2: a case study // *Lancet Infect. Dis.* 2021. V. 21(1). P. 52-58. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30764-7
60. To K.K., Hung I.F., Ip J.D., Chu A.W., Chan W.M., Tam A.R., Fong C.H., Yuan S., Tsoi H.W., Ng A.C., Lee L.L., Wan P., Tso E., To W.K., Tsang D., Chan K.H., Huang J.D., Kok K.H., Cheng V.C., Yuen K.Y. COVID-19 re-infection by a phylogenetically distinct SARS-coronavirus-2 strain confirmed by whole genome sequencing // *Clin. Infect. Dis.* 2020. ciaa1275. doi: 10.1093/cid/ciaa1275

61. Turner J.S., Day A., Alsoussi W.B., Liu Z., O'Halloran J.A., Presti R.M., Patterson B.K., Whelan S.P.J., Ellebedy A.H., Mudd P.A. SARS-CoV-2 Viral RNA Shedding for More Than 87 Days in an Individual With an Impaired CD8+ T Cell Response // *Front. Immunol.* 2021. V. 11. 618402. doi: 10.3389/fimmu.2020.618402
62. Tyson J.R., James P., Stoddart D., Sparks N., Wickenhagen A., Hall G., Choi J.H., Lapointe H., Kamelian K., Smith A.D., Prystajacky N., Goodfellow I., Wilson S.J., Harrigan R., Snutch T.P., Loman N.J., Quick J. Improvements to the ARTIC multiplex PCR method for SARS-CoV-2 genome sequencing using nanopore // *bioRxiv.* 2020. 2020.09.04.283077. doi: 10.1101/2020.09.04.283077
63. Vacca D., Fiannaca A., Tramuto F., Cancila V., La Paglia L., Mazzucco W., Gulino A., La Rosa M., Maida C.M., Morello G., Belmonte B., Casuccio A., Maugeri R., Iacopino G., Vitale F., Tripodo C., Urso A. Direct RNA nanopore sequencing of SARS-CoV-2 extracted from critical material from swabs // *medRxiv.2020.12.21.20191346.* doi.org/10.1101/2020.12.21.20191346
64. Valesano A.L., Rumfelt K.E., Dimcheff D.E., Blair C.N., Fitzsimmons W.J., Petrie J.G., Martin E.T., Lauring A.S. Temporal dynamics of SARS-CoV-2 mutation accumulation within and across infected hosts // *bioRxiv.* 2021. 2021.01.19.427330. doi: 10.1101/2021.01.19.427330
65. Wang D., Wang Y., Sun W., Zhang L., Ji J., Zhang Z., Cheng X., Li Y., Xiao F., Zhu A., Zhong B., Ruan S., Li J., Ren P., Ou Z., Xiao M., Li M., Deng Z., Zhong H., Li F., Wang W.J., Zhang Y., Chen W., Zhu S., Xu X., Jin X., Zhao J., Zhong N., Zhang W., Zhao J., Li J., Xu Y. Population Bottlenecks and Intra-host Evolution During Human-to-Human Transmission of SARS-CoV-2 // *Front. Med. (Lausanne).* 2021. V. 8. P. 585358. doi: 10.3389/fmed.2021.585358.
66. Wang Y., Wang D., Zhang L., Sun W., Zhang Z., Chen W., Zhu A., Huang Y., Xiao F., Yao J., Gan M., Li F., Luo L., Huang X., Zhang Y., Wong S.S., Cheng X., Ji J., Ou Z., Xiao M., Li M., Li J., Ren P., Deng Z., Zhong H., Xu X., Song T., Mok C.K.P., Peiris M., Zhong N., Zhao J., Li Y., Li J., Zhao J. Intra-host variation and evolutionary dynamics of SARS-CoV-2 populations in COVID-19 patients // *Genome Med.* 2021. V. 13(1). P. 30. doi: 10.1186/s13073-021-00847-5
67. Wibmer C.K., Ayres F., Hermanus T., Madzivhandila M., Kgagudi P., Oosthuysen B., Lambson B.E., de Oliveira T., Vermeulen M., van der Berg K., Rossouw T., Boswell M., Ueckermann V., Meiring S., von Gottberg A., Cohen C., Morris L., Bhiman J.N., Moore P.L. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma // *bioRxiv.* 2021 Jan 19:2021.01.18.427166. doi: 10.1101/2021.01.18.427166
68. Xia X. Extreme Genomic CpG Deficiency in SARS-CoV-2 and Evasion of Host Antiviral Defense // *Mol Biol Evol.* 2020. V.37(9).P.2699-2705. doi: 10.1093/molbev/msaa094
69. Xiao M., Liu X., Ji J., Li M., Li J., Yang L., Sun W., Ren P., Yang G., Zhao J., Liang T., Ren H., Chen T., Zhong H., Song W., Wang Y., Deng Z., Zhao Y., Ou Z., Wang D., Cai J., Cheng X., Feng T., Wu H., Gong Y., Yang H., Wang J., Xu X., Zhu S., Chen F., Zhang Y., Chen W., Li Y., Li J. Multiple approaches for massively parallel sequencing of SARS-CoV-2 genomes directly from clinical samples // *Genome Med.* 2020. V. 12(1). P. 57. doi: 10.1186/s13073-020-00751-4
70. Xu Y., Kang L., Shen Z., Li X., Wu W., Ma W., Fang C., Yang F., Jiang X., Gong S., Zhang L., Li M. Hybrid capture-based sequencing enables unbiased recovery of SARS-CoV-2 genomes from fecal samples and characterization of the dynamics of intra-host variants // *bioRxiv.* 2020. 07.30.230102. doi.org/10.1101/2020.07.30.230102
71. Zhou D., Dejnirattisai W., Supasa P., Liu C., Mentzer A.J., Ginn H.M., Zhao Y., Duyvesteyn H.M.E., Tuekprakhon A., Nutalai R., Wang B., Paesen G.C., Lopez-Camacho C., Slon-Campos J., Hallis B., Coombes N., Bewley K., Charlton S., Walter T.S., Skelly D., Lumley S.F., Dold C., Levin R., Dong T., Pollard A.J., Knight J.C., Crook D., Lambe T., Clutterbuck E., Bibi S., Flaxman A., Bittaye M., Belij-Rammerstorfer S., Gilbert S., James W., Carroll M.W., Klennerman P., Barnes E., Dunachie S.J., Fry E.E., Mongkolsapaya J., Ren J., Stuart D.I., Screaton G.R. Evidence of escape of SARS-CoV-2 variant B.1.351 from natural and vaccine-induced sera // *Cell.* 2021. S0092-8674(21)00226-9. doi: 10.1016/j.cell.2021.02.037

### References

1. Alvarez-Moreno CA, Rodriguez-Morales AJ. Testing Dilemmas: Post negative, positive SARS-CoV-2 RT-PCR - is it a reinfection? *Travel Med Infect Dis.* 2020. V.35. P.101743. doi: 10.1016/j.tmaid.2020.101743
2. Armero A., Berthet N., Avarre J.C. Intra-Host Diversity of SARS-Cov-2 Should Not Be Neglected: Case of the State of Victoria, Australia. *Viruses.* 2021. V. 13(1). P. 133. doi: 10.3390/v13010133
3. Baric R.S. Emergence of a Highly Fit SARS-CoV-2 Variant. *N Engl J Med.* 2020. V. 383(27). P. 2684-2686. doi: 10.1056/NEJMcibr2032888
4. Bendall M.L., Gibson K.M., Steiner M.C., Rentia U., Pérez-Losada M., Crandall K.A. HAPHPIPE: Haplotype Reconstruction and Phylodynamics for Deep Sequencing of Intra-Host Viral Populations. *Mol. Biol. Evol.* 2020. msaa315. doi: 10.1093/molbev/msaa315
5. Biswas S.K., Mudi S.R. Spike protein D614G and RdRp P323L: the SARS-CoV-2 mutations associated with severity of COVID-19. *Genomics Inform.* 2020. V. 18(4). e44. doi: 10.5808/GI.2020.18.4.e44

6. Cantin E.M., Lange W., Openshaw H. Application of polymerase chain reaction assays to studies of herpes simplex virus latency. *Intervirology*. 1991. V. 32(2). P. 93-100. doi: 10.1159/000150189
7. Cella E, Benedetti F, Fabris S, Borsetti A, Pezzuto A, Ciotti M, Pascarella S, Ceccarelli G, Zella D, Ciccozzi M, Giovanetti M. SARS-CoV-2 Lineages and Sub-Lineages Circulating Worldwide: A Dynamic Overview. *Chemotherapy*. 2021. V.18. P.1-5. doi: 10.1159/000515340
8. Chen T., Hudnall S.D. Anatomical mapping of human herpesvirus reservoirs of infection. *Mod. Pathol.* 2006. 19(5). P. 726-37. doi: 10.1038/modpathol.3800584
9. Chen Z, Boon SS, Wang MH, Chan RWY, Chan PKS. Genomic and evolutionary comparison between SARS-CoV-2 and other human coronaviruses. *J Virol Methods*. 2021. V.289. P.114032. doi: 10.1016/j.jviromet.2020.114032
10. Cheng X, Virk N, Chen W, Ji S, Ji S, Sun Y, Wu X. CpG usage in RNA viruses: data and hypotheses. *PLoS One*. 2013. V.8(9). e74109. doi: 10.1371/journal.pone.0074109
11. Colson P., Finaud M., Levy N., Lagier J.C., Raoult D. Evidence of SARS-CoV-2 re-infection with a different genotype. *J. Infect.* 2021. V. 82(4). P. 84-123. doi: 10.1016/j.jinf.2020.11.011
12. Dao T.L., Hoang V.T., Gautret P. Recurrence of SARS-CoV-2 viral RNA in recovered COVID-19 patients: a narrative review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2021. V. 40(1). P. 13-25. doi: 10.1007/s10096-020-04088-z
13. Davies N.G., Jarvis C.I.; CMMID COVID-19 Working Group, Edmunds WJ, Jewell NP, Diaz-Ordaz K., Keogh R.H. Increased mortality in community-tested cases of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7. *Nature*. 2021. doi: 10.1038/s41586-021-03426-1
14. Digard P, Lee HM, Sharp C, Grey F, Gaunt E. Intra-genome variability in the dinucleotide composition of SARS-CoV-2. *Virus Evol.* 2020. V.6(2). P.veaa057. doi: 10.1093/ve/veaa057
15. Du P., Song C., Li R., Song Y., Li J., Ding N., Zhang J., Song R., Han J., Gao G., Yue J., Duan A., Huang Y., An J., Wang J., Zhang F., Chen C., Zeng H. Specific re-distribution of SARS-CoV-2 variants in the respiratory system and intestinal tract. *Clin. Infect. Dis.* 2020. ciaa1617. doi: 10.1093/cid/ciaa1617
16. Erol A. Are the emerging SARS-COV-2 mutations friend or foe? *Immunol. Lett.* 2021. V. 230. P. 63-64. doi: 10.1016/j.imlet.2020.12.014
17. Eskier D., Suner A., Oktay Y., Karakulah G. Mutations of SARS-CoV-2 nsp14 exhibit strong association with increased genome-wide mutation load. *Peer J.* 2020. V.8. e10181. doi: 10.7717/peerj.10181
18. Fiorentini S, Messali S, Zani A, Caccuri F, Giovanetti M, Ciccozzi M, Caruso A. First detection of SARS-CoV-2 spike protein N501 mutation in Italy in August, 2020. *Lancet Infect Dis.* 2021. S1473-3099(21)00007-4. doi: 10.1016/S1473-3099(21)00007-4
19. Forster P., Forster L., Renfrew C., Forster M. Phylogenetic network analysis of SARS-CoV-2 genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020. V.117(17). P. 9241-9243. doi: 10.1073/pnas.2004999117
20. Freed N.E., Vlková M., Faisal M.B., Silander O.K. Rapid and inexpensive whole-genome sequencing of SARS-CoV-2 using 1200 bp tiled amplicons and Oxford Nanopore Rapid Barcoding. *Biol. Methods Protoc.* 2020. V. 5(1):bpaa014. doi: 10.1093/biomethods/bpaa014
21. Garafutdinov R.R., Mavzyutov A.R., Alekseev Ya.I., Vorobev A.A., Nikonorov Yu.M., Chubukova O.V., Matniyazov R.T., Baymiev An.Kh., Maksimov I.V., Kuluev B.R., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. Human betacoronaviruses and their highly sensitive detection by PCR and other amplification methods. *Biomics.* 2020. V.12(1). P. 121-179. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-7 (In Russian)
22. Garafutdinov R.R., Mavzyutov A.R., Nikonorov Yu.M., Chubukova O.V., Matniyazov R.T., Baymiev An.Kh., Maksimov I.V., Miftakhov I.Yu., Khalikova E.Yu., Kuluev B.R., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. Betacoronavirus SARS-CoV-2, its genome, variety of genotypes and molecular-biological approaches to combat it. *Biomics.* 2020. V.12(2). P. 242-271. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-15 (In Russian)
23. Gibson K.M., Steiner M.C., Rentia U., Bendall M.L., Pérez-Losada M., Crandall K.A. Validation of Variant Assembly Using HAPHIPE with Next-Generation Sequence Data from Viruses. *Viruses.* 2020. V. 12(7). P. 758. doi: 10.3390/v12070758
24. Gohl D.M., Garbe J., Grady P., Daniel J., Watson R.H.B., Auch B., Nelson A., Yohe S., Beckman K.B. A rapid, cost-effective tailed amplicon method for sequencing SARS-CoV-2. *BMC Genomics.* 2020. V. 21(1). P. 863. doi: 10.1186/s12864-020-07283-6
25. Grubaugh N.D., Gangavarapu K., Quick J., Matteson N.L., De Jesus J.G., Main B.J., Tan A.L., Paul L.M., Brackney D.E., Grewal S., Gurfield N., Van Rompay K.K.A., Isern S., Michael S.F., Coffey L.L., Loman N.J., Andersen K.G. An amplicon-based sequencing framework for accurately measuring intrahost virus diversity using PrimalSeq and iVar. *Genome Biol.* 2019. V. 20(1). P. 8. doi: 10.1186/s13059-018-1618-7
26. Itokawa K., Sekizuka T., Hashino M., Tanaka R., Kuroda M. Disentangling primer interactions improves SARS-CoV-2 genome sequencing by multiplex tiling PCR. *PLoS One.* 2020. V. 15(9). e0239403. doi: 10.1371/journal.pone.0239403
27. Itokawa K., Sekizuka T., Hashino M., Tanaka R., Kuroda M. Disentangling primer interactions improves SARS-Cov-2 genome sequencing by the ARTIC Networks

- multiplex PCR. *bioRxiv*. 2020.03.10.985150. doi.org/10.1101/2020.03.10.985150
28. Jackson C.B., Zhang L., Farzan M., Choe H. Functional importance of the D614G mutation in the SARS-CoV-2 spike protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2021. V. 538. P. 108-115. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.11.026
29. Jaworski E., Langsjoen R.M., Judy B., Newman P., Plante J.A., Plante K.S., Miller A.L., Zhou Y., Swetnam D., Dong J., Ren P., Pyles R.B., Ksiazek T., Menachery V.D., Weaver S.C., Routh A. Tiled-ClickSeq for targeted sequencing of complete coronavirus genomes with simultaneous capture of RNA recombination and minority variants. *bioRxiv*. 2021. 2021.03.10.434828. doi: 10.1101/2021.03.10.434828
30. Kannan S.R., Spratt A.N., Quinn T.P., Heng X., Lorson C.L., Sönnnerborg A., Byrareddy S.N., Singh K. Infectivity of SARS-CoV-2: there Is Something More than D614G? *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2020. V. 15(4). P. 574-577. doi: 10.1007/s11481-020-09954-3
31. Kim D., Lee J.Y., Yang J.S., Kim J.W., Kim V.N., Chang H. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell*. 2020. V. 181(4). P. 914-921.e10. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.011
32. Komissarov AB, Safina KR, Garushyants SK, Fadeev AV, Sergeeva MV, Ivanova AA, Danilenko DM, Lioznov D, Shneider OV, Shvyrev N, Spirin V, Glyzin D, Shchur V, Bazykin GA. Genomic epidemiology of the early stages of the SARS-CoV-2 outbreak in Russia. *Nat Commun.* 2021. V.12(1). P.649. doi: 10.1038/s41467-020-20880-z
33. Kozlovskaya L, Pinaeva A, Ignatyev G, Selivanov A, Shishova A, Kovpak A, Gordeychuk I, Ivin Y, Berestovskaya A, Prokhortchouk E, Protsenko D, Rychev M, Ishmukhametov A. Isolation and phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 variants collected in Russia during the COVID-19 outbreak. *Int J Infect Dis.* 2020. V.99. P.40-46. doi: 10.1016/j.ijid.2020.07.024
34. Lauring A.S., Andino R. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog.* 2010. V. 6(7). e1001005. doi: 10.1371/journal.ppat.1001005
35. Leung K., Shum M.H., Leung G.M., Lam T.T., Wu J.T. Early transmissibility assessment of the N501Y mutant strains of SARS-CoV-2 in the United Kingdom, October to November 2020. *Euro Surveill.* 2021. V. 26(1). 2002106. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.26.1.2002106
36. Li Q., Zheng X.S., Shen X.R., Si H.R., Wang X., Wang Q., Li B., Zhang W., Zhu Y., Jiang R.D., Zhao K., Wang H., Shi Z.L., Zhang H.L., Du R.H., Zhou P. Prolonged shedding of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in patients with COVID-19. *Emerg. Microbes Infect.* 2020. V. 9(1). P. 2571-2577. doi: 10.1080/22221751.2020.1852058
37. Maggi F., Novazzi F., Genoni A., Baj A., Spezia P.G., Focosi D., Zago C., Colombo A., Cassani G., Pasciuta R., Tamborini A., Rossi A., Prestia M., Capuano R., Azzi L., Donadini A., Catanoso G., Grossi P.A., Maffioli L., Bonelli G. Imported SARS-CoV-2 Variant P.1 in Traveler Returning from Brazil to Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 2021. V. 27(4). P. 1249-1251. doi: 10.3201/eid2704.210183
38. Mahase E. Covid-19: What new variants are emerging and how are they being investigated? *BMJ*. 2021. V. 18. 372:n158. doi: 10.1136/bmj.n158
39. Maurano M.T., Ramaswami S., Zappile P., Dimartino D., Boytard L., Ribeiro-Dos-Santos A.M., Vulpescu N.A., Westby G., Shen G., Feng X., Hogan M.S., Ragonnet-Cronin M., Geidelberg L., Marier C., Meyn P., Zhang Y., Cadley J., Ordoñez R., Luther R., Huang E., Guzman E., Arguelles-Grande C., Argyropoulos K.V., Black M., Serrano A., Call M.E., Kim M.J., Belovarac B., Gindin T., Lytle A., Pinnell J., Vougiouklakis T., Chen J., Lin L.H., Rapkiewicz A., Raabe V., Samanovic M.I., Jour G., Osman I., Aguero-Rosenfeld M., Mulligan M.J., Volz E.M., Cotzia P., Snuderl M., Heguy A. Sequencing identifies multiple early introductions of SARS-CoV-2 to the New York City region. *Genome Res.* 2020. V. 30(12). P. 1781-1788. doi: 10.1101/gr.266676.120
40. Mavzyutov A.R., Garafutdinov R.R., Khalikova E.Yu., Yuldashev R.A., Khusainova R.I., Chubukova O.V., Gimalov F.R., Matniyazov R.T., Alekseev Ya.I., Vorobev A.A., Vershinina Z.R., Miftakhov I.Yu., Nikonov Yu.M., Maksimov I.V., Kuluev B.R., Baymiev An.Kh., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. Problematic aspects of diagnostics of SARS-CoV-2 coronavirus infection using reverse-transcriptional PCR. *Biomics.* 2020. V.12(4). P. 564-590. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-50 (In Russian)
41. Mostafa H.H., Fissel J.A., Fanelli B., Bergman Y., Gniazdowski V., Dadlani M., Carroll K.C., Colwell R.R., Simmer P.J. Metagenomic Next-Generation Sequencing of Nasopharyngeal Specimens Collected from Confirmed and Suspect COVID-19 Patients. *mBio.* 2020. V. 11(6). e01969-20. doi: 10.1128/mBio.01969-20
42. Motayo B.O., Oluwasemowo O.O., Oluola B.A., Akinduti P.A., Arege O.T., Obafemi Y.D., Faneye A.O., Isibor P.O., Aworunse O.S., Oranusi S.U. Evolution and genetic diversity of SARS-CoV-2 in Africa using whole genome sequences. *Int J Infect Dis.* 2021. V. 103. P. 282 - 287. doi: 10.1016/j.ijid.2020.11.190
43. Moyo-Gwete T., Madzivhandila M., Makhado Z., Ayres F., Mhlanga D., Oosthuysen B., Lambson B.E., Kgagudi P., Tegally H., Iranzadeh A., Doolabh D., Tyers L., Chinhoyi L.R., Mennen M., Skelm S., Wibmer C.K., Bhiman J.N., Ueckermann V., Rossouw T., Boswell M., de Oliveira T., Williamson C., Burgers W.A., Ntusi N., Morris L., Moore P.L. SARS-CoV-2 501Y.V2 (B.1.351) elicits cross-reactive neutralizing antibodies. *bioRxiv*. 2021 Mar 6:2021.03.06.434193. doi: 10.1101/2021.03.06.434193

44. Paden C.R., Tao Y., Queen K., Zhang J., Li Y., Uehara A., Tong S. Rapid, Sensitive, Full-Genome Sequencing of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Emerg. Infect. Dis.* 2020. V. 26(10). P. 2401-2405. doi: 10.3201/eid2610.201800
45. Pillay S., Giandhari J., Tegally H., Wilkinson E., Chimukangara B., Lessells R., Moosa Y., Mattison S., Gazy I., Fish M., Singh L., Khanyile K.S., San J.E., Fonseca V., Giovanetti M., Alcantara L.C.Jr., de Oliveira T. Whole Genome Sequencing of SARS-CoV-2: Adapting Illumina Protocols for Quick and Accurate Outbreak Investigation during a Pandemic. *Genes (Basel)*. 2020. V. 11(8). P. 949. doi: 10.3390/genes11080949
46. Platto S., Wang Y., Zhou J., Carafoli E. History of the COVID-19 pandemic: Origin, explosion, worldwide spreading. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2021. V. 538. P. 14-23. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.10.087
47. Rambaut A., Holmes EC, O'Toole Á, Hill V, McCrone JT, Ruis C, du Plessis L, Pybus OG. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nat Microbiol.* 2020. V.5(11). P.1403-1407. doi: 10.1038/s41564-020-0770-5
48. Rambaut A., Holmes EC, O'Toole Á, Hill V, McCrone JT, Ruis C, du Plessis L, Pybus OG. Addendum: A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nat Microbiol.* 2021. V.6(3).P.415. doi: 10.1038/s41564-021-00872-5
49. Rato S., Golumbeanu M., Telenti A., Ciuffi A. Exploring viral infection using single-cell sequencing. *Virus Res.* 2017. V. 239. P. 55-68. doi: 10.1016/j.virusres.2016.10.016
50. Riggioni C, Comberiat P, Giovannini M, Agache I, Akdis M, Alves-Correia M, Antó JM, Arcolaci A, Azkur AK, Azkur D, Beken B, Boccabella C, Bousquet J, Breiteneder H, Carvalho D, De Las Vecillas L, Diamant Z, Eguiluz-Gracia I, Eiwegger T, Eyerich S, Fokkens W, Gao YD, Hannachi F, Johnston SL, Jutel M, Karavelia A, Klimek L, Moya B, Nadeau KC, O'Hehir R, O'Mahony L, Pfaar O, Sanak M, Schwarze J, Sokolowska M, Torres MJ, van de Veen W, van Zelm MC, Wang Y, Zhang L, Jiménez-Saiz R, Akdis CA. A compendium answering 150 questions on COVID-19 and SARS-CoV-2. *Allergy.* 2020. V.75(10). P.2503-2541. doi: 10.1111/all.14449
51. Salehi-Vaziri M., Jalali T., Farahmand B., Fotouhi F., Banifazl M., Pouriayevali M.H., Sadat Larijani M., Afzali N., Ramezani A. Clinical characteristics of SARS-CoV-2 by re-infection vs. reactivation: a case series from Iran. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2021. V. 18. P. 1–7. doi: 10.1007/s10096-021-04221-6
52. Sapoval N., Mahmoud M., Jochum M.D., Liu Y., Elworth R.A.L., Wang Q., Albin D., Ogilvie H.A., Lee M.D., Villapol S., Hernandez K.M., Maljkovic Berry I., Foox J., Beheshti A., Ternus K., Aagaard K.M., Posada D., Mason C.E., Sedlazeck F.J., Treangen T.J. SARS-CoV-2 genomic diversity and the implications for qRT-PCR diagnostics and transmission. *Genome Res.* 2021. V. 31(4):635-644. doi: 10.1101/gr.268961.120
53. Selhorst P., Van Ierssel S., Michiels J., Mariën J., Bartholomeeusen K., Dirinck E., Vandamme S., Jansens H., Ariën K.K. Symptomatic SARS-CoV-2 reinfection of a health care worker in a Belgian nosocomial outbreak despite primary neutralizing antibody response. *Clin. Infect. Dis.* 2020. ciaa1850. doi: 10.1093/cid/ciaa1850
54. Sender R, Bar-On YM, Flamholz A, Gleizer S, Bernsthein B, Phillips R, Milo R. The total number and mass of SARS-CoV-2 virions in an infected person. *medRxiv.* 2020. Nov 17; 2020.11.16.20232009. doi: 10.1101/2020.11.16.20232009
55. Singh J., Samal J., Kumar V., Sharma J., Agrawal U., Ehtesham N.Z., Sundar D., Rahman S.A., Hira S., Hasnain S.E. Structure-Function Analyses of New SARS-CoV-2 Variants B.1.1.7, B.1.351 and B.1.1.28.1: Clinical, Diagnostic, Therapeutic and Public Health Implications. *Viruses.* 2021. V. 13(3). 439. doi: 10.3390/v13030439
56. Subramanian S. The Long-Term Evolutionary History of Gradual Reduction of CpG Dinucleotides in the SARS-CoV-2 Lineage. *Biology (Basel)*. 2021. V.10(1). P.52. doi: 10.3390/biology10010052
57. Taiaroa G., DanielRawlinson, Featherstone L, Miranda Pitt M., Caly L., Druce J., Purcell D., Harty L., Tran T., Roberts J., Scott N., Catton M., Williamson D., Coin L., Duchene S. Direct RNA sequencing and early evolution of SARS-CoV-2. *bioRxiv.* 2020. 03.05.976167. doi.org/10.1101/2020.03.05.976167
58. Tang J.W., Toovey O.T.R., Harvey K.N., Hui D.D.S. Introduction of the South African SARS-CoV-2 variant 501Y.V2 into the UK. *J Infect.* 2021. V. 82(4). P. e8–e10. doi: 10.1016/j.jinf.2021.01.007
59. Tillett R.L., Sevinsky J.R., Hartley P.D., Kerwin H., Crawford N., Gorzalski A., Laverdure C., Verma S.C., Rossetto C.C., Jackson D., Farrell M.J., Van Hooser S., Pandori M. Genomic evidence for reinfection with SARS-CoV-2: a case study. *Lancet Infect. Dis.* 2021. V. 21(1). P. 52-58. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30764-7
60. To K.K., Hung I.F., Ip J.D., Chu A.W., Chan W.M., Tam A.R., Fong C.H., Yuan S., Tsoi H.W., Ng A.C., Lee L.L., Wan P., Tso E., To W.K., Tsang D., Chan K.H., Huang J.D., Kok K.H., Cheng V.C., Yuen K.Y. COVID-19 re-infection by a phylogenetically distinct SARS-coronavirus-2 strain confirmed by whole genome sequencing. *Clin. Infect. Dis.* 2020. ciaa1275. doi: 10.1093/cid/ciaa1275
61. Turner J.S., Day A., Alsoussi W.B., Liu Z., O'Halloran J.A., Presti R.M., Patterson B.K., Whelan S.P.J., Ellebedy A.H., Mudd P.A. SARS-CoV-2 Viral RNA Shedding for More Than 87 Days in an Individual With an Impaired CD8+ T Cell Response. *Front. Immunol.* 2021. V. 11. 618402. doi: 10.3389/fimmu.2020.618402

62. Tyson J.R., James P., Stoddart D., Sparks N., Wickenhagen A., Hall G., Choi J.H., Lapointe H., Kamelian K., Smith A.D., Prystajcky N., Goodfellow I., Wilson S.J., Harrigan R., Snutch T.P., Loman N.J., Quick J. Improvements to the ARTIC multiplex PCR method for SARS-CoV-2 genome sequencing using nanopore. *bioRxiv*. 2020. 2020.09.04.283077. doi: 10.1101/2020.09.04.283077
63. Vacca D., Fiannaca A., Tramuto F., Cancila V., La Paglia L., Mazzucco W., Gulino A., La Rosa M., Maida C.M., Morello G., Belmonte B., Casuccio A., Maugeri R., Iacopino G., Vitale F., Tripodo C., Urso A. Direct RNA nanopore sequencing of SARS-CoV-2 extracted from critical material from swabs. *medRxiv*. 2020.12.21.20191346. doi.org/10.1101/2020.12.21.20191346
64. Valesano A.L., Rumpfelt K.E., Dimcheff D.E., Blair C.N., Fitzsimmons W.J., Petrie J.G., Martin E.T., Luring A.S. Temporal dynamics of SARS-CoV-2 mutation accumulation within and across infected hosts. *bioRxiv*. 2021. 2021.01.19.427330. doi: 10.1101/2021.01.19.427330
65. Wang D., Wang Y., Sun W., Zhang L., Ji J., Zhang Z., Cheng X., Li Y., Xiao F., Zhu A., Zhong B., Ruan S., Li J., Ren P., Ou Z., Xiao M., Li M., Deng Z., Zhong H., Li F., Wang W.J., Zhang Y., Chen W., Zhu S., Xu X., Jin X., Zhao J., Zhong N., Zhang W., Zhao J., Li J., Xu Y. Population Bottlenecks and Intra-host Evolution During Human-to-Human Transmission of SARS-CoV-2. *Front. Med. (Lausanne)*. 2021. V. 8. P. 585358. doi: 10.3389/fmed.2021.585358.
66. Wang Y., Wang D., Zhang L., Sun W., Zhang Z., Chen W., Zhu A., Huang Y., Xiao F., Yao J., Gan M., Li F., Luo L., Huang X., Zhang Y., Wong S.S., Cheng X, Ji J., Ou Z., Xiao M., Li M., Li J., Ren P., Deng Z., Zhong H., Xu X., Song T., Mok C.K.P., Peiris M., Zhong N., Zhao J., Li Y., Li J., Zhao J. Intra-host variation and evolutionary dynamics of SARS-CoV-2 populations in COVID-19 patients. *Genome Med*. 2021. V. 13(1). P. 30. doi: 10.1186/s13073-021-00847-5
67. Wibmer C.K., Ayres F., Hermanus T., Madzivhandila M., Kgagudi P., Oosthuysen B., Lambson B.E., de Oliveira T., Vermeulen M., van der Berg K., Rossouw T., Boswell M., Ueckermann V., Meiring S., von Gottberg A., Cohen C., Morris L., Bhiman J.N., Moore P.L. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. *bioRxiv*. 2021 Jan 19:2021.01.18.427166. doi: 10.1101/2021.01.18.427166
68. Xia X. Extreme Genomic CpG Deficiency in SARS-CoV-2 and Evasion of Host Antiviral Defense. *Mol Biol Evol*. 2020. V.37(9).P.2699-2705. doi: 10.1093/molbev/msaa094
69. Xiao M., Liu X., Ji J., Li M., Li J., Yang L., Sun W., Ren P., Yang G., Zhao J., Liang T., Ren H., Chen T., Zhong H., Song W., Wang Y., Deng Z., Zhao Y., Ou Z., Wang D., Cai J., Cheng X., Feng T., Wu H., Gong Y., Yang H., Wang J., Xu X., Zhu S., Chen F., Zhang Y., Chen W., Li Y., Li J. Multiple approaches for massively parallel sequencing of SARS-CoV-2 genomes directly from clinical samples. *Genome Med*. 2020. V. 12(1). P. 57. doi: 10.1186/s13073-020-00751-4
70. Xu Y., Kang L., Shen Z., Li X., Wu W., Ma W., Fang C., Yang F., Jiang X., Gong S., Zhang L., Li M. Hybrid capture-based sequencing enables unbiased recovery of SARS-CoV-2 genomes from fecal samples and characterization of the dynamics of intra-host variants. *bioRxiv*. 2020. 07.30.230102. doi.org/10.1101/2020.07.30.230102
71. Zhou D., Dejnirattisai W., Supasa P., Liu C., Mentzer A.J., Ginn H.M., Zhao Y., Duyvesteyn H.M.E., Tuekprakhon A., Nutalai R., Wang B., Paesen G.C., Lopez-Camacho C., Slon-Campos J., Hallis B., Coombes N., Bewley K., Charlton S., Walter T.S., Skelly D., Lumley S.F., Dold C., Levin R., Dong T., Pollard A.J., Knight J.C., Crook D., Lambe T., Clutterbuck E., Bibi S., Flaxman A., Bittaye M., Belij-Rammerstorfer S., Gilbert S., James W., Carroll M.W., Klennerman P., Barnes E., Dunachie S.J., Fry E.E., Mongkolsapaya J., Ren J., Stuart D.I., Sreaton G.R. Evidence of escape of SARS-CoV-2 variant B.1.351 from natural and vaccine-induced sera. *Cell*. 2021. S0092-8674(21)00226-9. doi: 10.1016/j.cell.2021.02.037