

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ



НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-72>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Мониторинг распространения вариантов SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus*) на территории Московского региона с помощью таргетного высокопроизводительного секвенирования

Борисова Н.И.^{1*}, Котов И.А.^{1,2*}, Колесников А.А.¹, Каптелова В.В.¹, Сперанская А.С.¹,
Кондрашева Л.Ю.¹, Тиванова Е.В.¹, Хафизов К.Ф.¹, Акимкин В.Г.¹

¹ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 111123, Москва, Россия;

²ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», 141700, Долгопрудный, Россия

Введение. С начала пандемического распространения инфекции COVID-19, вызываемой коронавирусом SARS-CoV-2, международное научное сообщество регулярно фиксирует появление мутаций этого патогена, потенциально способных повысить его контагиозность и/или вирулентность. В частности, с конца 2020 г. в мире обнаружено несколько вызывающих озабоченность вариантов, включая альфа (B.1.1.7), бета (B.1.351), гамма (P.1) и дельта (B.1.617.2). Однако существующие механизмы поиска мутаций и выявления штаммов не всегда бывают достаточно эффективными, поскольку лишь небольшая доля получаемых от пациентов образцов возбудителя может быть исследована на наличие генетических изменений, например методом полногеномного секвенирования из-за его высокой стоимости.

Материал и методы. В исследовании применён способ таргетного высокопроизводительного секвенирования нового (следующего) поколения (next generation sequencing, NGS) наиболее значимых регионов гена, кодирующего S-гликопротеин (шиповидный, spike) вируса SARS-CoV-2, для чего разработана соответствующая праймерная панель. В среднем на платформе Illumina на 1 образец приходилось около 50 тыс. парноконцевых прочтений длиной ≥ 150 п.н. С помощью описанной методики нами исследованы 579 случайных образцов, полученных у проживающих в Московском регионе пациентов с новой коронавирусной инфекцией с февраля по июнь 2021 г.

Результаты. В работе продемонстрирована динамика представленности в Российской Федерации ряда штаммов нового коронавируса и нескольких его мутаций на протяжении февраля–июня 2021 г. Установлено, что штамм дельта появился на территории Москвы и Московской области в мае текущего года, а в июне стал доминирующим, частично вытеснив другие разновидности вируса.

Обсуждение. Полученные данные представляют возможность определять принадлежность образцов к упомянутым и некоторым другим штаммам, а описанный подход может быть использован для стандартизации процедуры поиска новых и существующих разновидностей SARS-CoV-2. Методика делает возможным изучение большого количества образцов в короткие сроки, позволяя получать более детальное представление об эпидемиологической ситуации в регионе.

Ключевые слова: *коронавирус; коронавирусная инфекция; SARS-CoV-2; секвенирование нового поколения; геном; штаммы*

Для цитирования: Борисова Н.И., Котов И.А., Колесников А.А., Каптелова В.В., Сперанская А.С., Кондрашева Л.Ю., Тиванова Е.В., Хафизов К.Ф., Акимкин В.Г. Мониторинг распространения вариантов SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus*) на территории Московского региона с помощью таргетного высокопроизводительного секвенирования. *Вопросы вирусологии.* 2021; 66(4): 269-278. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-72>

Для корреспонденции: Хафизов Камилль Фаридович, канд. биол. наук, руководитель научной группы разработки новых методов диагностики на основе технологий секвенирования следующего поколения отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии, ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 111123, Москва, Россия. E-mail: kkhafizov@gmail.com

*Первые авторы статьи

Участие авторов: Борисова Н.И. – написание текста, выполнение экспериментов; Котов И.А. – написание текста, подготовка иллюстраций, биоинформатический анализ; Колесников А.А. – выполнение экспериментов; Каптелова В.В. – выполнение экспериментов; Сперанская А.С. – выполнение экспериментов; Кондрашева Л.Ю. – организация сбора биологического материала, постановка полимеразной цепной реакции; Тиванова Е.В. – организация сбора биологического материала; Хафизов К.Ф. – написание текста, сбор и обработка материалов, подготовка иллюстраций, биоинформатический анализ, общая редакция статьи; Акимкин В.Г. – написание резюме, научное редактирование и общая редакция статьи.

Финансирование. Исследование выполнено за счет Государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора) (Протокол № 111 от 22 декабря 2020 г.)

Поступила 1.07.2021

Принята к печати 14.08.2021

Опубликована 31.08.2021

ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-72>

Monitoring the spread of the SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus*) variants in the Moscow region using targeted high-throughput sequencing

Nadezhda I. Borisova^{1*}, Ivan A. Kotov^{1,2*}, Anton A. Kolesnikov¹, Valeria V. Kaptelova¹, Anna S. Speranskaya¹, Larisa Yu. Kondrasheva¹, Elena V. Tivanova¹, Kamil F. Khafizov¹, Vasily G. Akimkin¹

¹FSBI «Central Research Institute for Epidemiology» of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), Moscow, 111123, Russia

²FSAEI HE «Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University)», 141700, Dolgoprudny, Russia

Introduction. Since the outbreak of the COVID-19 pandemic caused by SARS-CoV-2 novel coronavirus, the international community has been concerned about the emergence of mutations altering some biological properties of the pathogen like increasing its infectivity or virulence. Particularly, since the end of 2020, several variants of concern have been identified around the world, including Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), and Delta (B.1.617.2). However, the existing mechanism of detecting important mutations are not always effective enough, since only a relatively small part of all pathogen samples can be examined by whole genome sequencing due to its high cost.

Material and methods. In this study, we have designed special primer panel and used it for targeted high-throughput sequencing of several significant S-gene (spike) regions of SARS-CoV-2. The Illumina platform averaged approximately 50,000 paired-end reads with a length of ≥ 150 bp per sample. This method was used to examine 579 random samples obtained from COVID-19 patients in Moscow and the Moscow region from February to June 2021.

Results. This study demonstrated the dynamics of distribution of several SARS-CoV-2 strains and its some single mutations. It was found that the Delta strain appeared in the region in May 2021, and became prevalent in June, partially displacing other strains.

Discussion. The obtained results provide an opportunity to assign the viral samples to one of the strains, including the previously mentioned in time- and cost-effective manner. The approach can be used for standardization of the procedure of searching for mutations in individual regions of the SARS-CoV-2 genome. It allows to get a more detailed data about the epidemiological situation in a region.

Key words: coronavirus; coronavirus infection, SARS-CoV-2; next generation sequencing; COVID-19; genome; strains

For citation: Borisova N.I., Kotov I.A., Kolesnikov A.A., Kaptelova V.V., Speranskaya A.S., Kondrasheva L.Yu., Tivanova E.V., Khafizov K.F., Akimkin V.G. Monitoring the spread of the SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus*) variants in the Moscow region using targeted high-throughput sequencing. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(4): 269–278. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-72>

For correspondence: Kamil F. Khafizov, Ph.D. (Biol.), Head of the Scientific Group for the Development of New Diagnostic Methods, Department of Molecular Diagnostics and Epidemiology, FSBI «Central Research Institute for Epidemiology» of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), Moscow, 111123, Russia. E-mail: kkhafizov@gmail.com

* Shared first co-authorship

Information about the authors:

Borisova N.I., <http://orcid.org/0000-0002-9672-0648>
Kotov I.A., <http://orcid.org/0000-0003-2416-5689>
Kolesnikov A.A., <http://orcid.org/0000-0003-3480-953X>
Kaptelova V.V., <http://orcid.org/0000-0003-0952-0830>
Speranskaya A.S., <http://orcid.org/0000-0001-6326-1249>
Kondrasheva L.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-0147-4262>
Tivanova E.V., <http://orcid.org/0000-0003-1286-2612>
Khafizov K.F., <http://orcid.org/0000-0001-5524-0296>
Akimkin V.G., <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

Contribution: Borisova N.I. – writing of the text, performing experiments; Kotov I.A. – writing of the text, preparing of the illustrations, bioinformatics analysis; Kolesnikov A.A. – performing experiments; Kaptelova V.V. – performing experiments; Speranskaya A.S. – performing experiments; Kondrasheva L.Yu. – organization of collection of biological material, polymerase chain reaction analysis; Tivanova E.V. – organization of the biological material collection; Khafizov K.F. – writing of the text, collection and processing of the materials, preparation of the illustrations, bioinformatics analysis, general edition of the article; Akimkin V.G. – writing of the resume, scientific editing, general edition of the article.

Funding. The research was funded by the State budget.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of FSBI «Central Research Institute for Epidemiology» of the Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor) (Protocol No. 111 dated December 22, 2020).

Received: 1 July 2021
Accepted: 14 August 2021
Published: 31 August 2021

Введение

С момента первого выявления в декабре 2019 г. в Ухане (Китайская Народная республика (КНР)) [1] новый коронавирус SARS-CoV-2 распространился по всему миру и стал причиной >4 млн смертей [2]. За время, прошедшее с начала пандемии, выработан ряд эффективных терапевтических и профилактических мер борьбы с новой коронавирусной инфекцией COVID-19. Сюда относится применение иммунологических препаратов, например моноклональных антител (АТ) [3, 4] и вакцин [5–8], в качестве антигена для которых, как правило, выступает шиповидный (spike) S-белок вируса.

В конце 2020 г. международное научное сообщество описало несколько вызывающих настороженность вариантов SARS-CoV-2, которые требуют особого внимания. Это прежде всего альфа (ранее имевший название «британский», В.1.1.7), бета («южноафриканский», В.1.351), гамма («бразильский», Р.1) и дельта («индийский», В.1.617.2). Указанные разновидности вируса заинтересовали исследователей после того, как в ряде географических регионов планеты стали появляться сообщения об учащении случаев передачи данных инфекционных агентов от человека к человеку, а впоследствии новые варианты патогена были обнаружены во многих странах. Например, вариант альфа быстро распространился на юго-востоке Великобритании, где вызвал большое количество эпизодов заболевания, и вскоре после этого был выявлен в США (Центры по контролю и профилактике заболеваний, Centers for Disease Control and Prevention (CDC)) [9], сделавшись доминирующим на территории этой страны к апрелю 2021 г. Аналогичным образом варианты из Южно-Африканской Республики (ЮАР) и Бразилии обусловили вспышки COVID-19 в этих государствах. Перечисленные разновидности SARS-CoV-2 также вызывают озабоченность, поскольку содержат

в S-белке мутацию E484K, которая, вероятно, снижает эффективность некоторых терапевтических моноклональных АТ, затрудняет нейтрализацию вируса *in vitro* и может привести к его потенциальному уходу от иммунной защиты, сформировавшейся после ранее перенесённой инфекции или вакцинации [8, 10–14].

Кроме того, 3 варианта (альфа, бета и гамма) имеют на уровне ключевого участка S-белка (рецептор-связывающего домена, receptor binding domain (RBD)) мутацию N501Y, ассоциированную с повышенной аффинностью к рецептору ангиотензинпревращающего фермента 2 (АПФ2) (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2). Это, в свою очередь, может способствовать повышенной трансмиссивности возбудителя [15, 16]. Ранее специалистами ФБУН Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (ЦНИИЭ) был разработан набор реагентов для быстрого выявления данной мутации в геноме вируса с помощью метода петлевой изотермической амплификации (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) [17], что позволило резко сократить число образцов, передаваемых на полногеномное секвенирование с целью выявления и мониторинга содержащих мутацию N501Y новых штаммов. Однако дальнейшее появление подобных штаммов, в том числе характеризующихся другими мутациями в гене S-белка, показало, что геномные замены в местах посадки праймеров для LAMP могут снижать эффективность указанной методики. В дополнение к этому по мере обнаружения и изучения вариантов SARS-CoV-2 возрастает перечень мутационных изменений, вызывающих интерес и подлежащих отслеживанию. Например, в мае 2021 г. в РФ обнаружен штамм дельта, ранее ставший причиной высокой заболеваемости в Индии, причём его распространённость на территории нашей страны с этого времени стремительно росла. Более того, в России также выявлены локальные штаммы,

в том числе сибирский (B.1.1.397+) и северо-западный (B.1.1.370.1), несущие мутации в гене S-белка [18, 19]. На данный момент изучение представленности циркулирующих в Российской Федерации штаммов продолжается [20]. В силу приведённых причин учёным требуются более эффективные и универсальные инструменты для определения целого ряда важных мутаций в рамках одного цикла лабораторного исследования. И хотя полногеномное секвенирование вируса – безусловно, наиболее детальный способ генетического анализа [21], с экономической точки зрения при современном уровне развития методов секвенирования такой подход не всегда оптимален. Его применение затруднительно в условиях постоянного роста числа случаев COVID-19, включая возможные повторные эпизоды заболевания. К тому же определение полной генетической последовательности может оказаться нерациональным в плане оперативного эпидемиологического надзора с учётом того, что наиболее значимые изменения происходят в небольшой части вирусного генома.

В настоящей статье мы описываем идентификацию изолятов, относящихся к различным вариантам SARS-CoV-2 (включая штаммы альфа, бета и дельта), с помощью таргетного высокопроизводительного секвенирования нового (следующего) поколения. Для этого нами разработана праймерная панель, позволяющая быстро и эффективно проводить целевую амплификацию геномных фрагментов, избегая этапа лигирования адаптеров при подготовке образцов к секвенированию благодаря модификации олигонуклеотидов на стадии синтеза. Амплифицируемые участки включают наиболее значимые с эпидемиологической точки зрения мутации, соответствующие аминокислотным заменам K417T, L452R, T478K, E484K, S494P, N501Y, A570D, P681H и другим, а также делеции HV69–70 и Y144 (рис. 1). Это даёт возможность не только кардинально снизить стоимость пробоподготовки, но и на порядки сократить объём генерируемых данных, вследствие чего становится доступным изучение большого количества образцов

вируса за короткий промежуток времени. Последнее особенно важно в случаях, когда требуется срочно установить представленность различных штаммов на рассматриваемой территории. С помощью новой праймерной панели нами исследованы 579 случайных образцов вируса, отобранных в феврале–июне 2021 г. в Москве и Московской области, а также показано изменение частот отдельных мутаций и штаммов в этом регионе.

Материал и методы

В исследовании использован биологический материал, полученный при взятии назофарингеальных мазков, от пациентов с симптомами новой коронавирусной инфекции. У этих лиц наличие SARS-CoV-2 было подтверждено методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-РВ) с применением набора реагентов АмплиСенс Cov-Bat-FL («АмплиСенс», Россия). Исследование проводилось при информированном согласии пациентов; протокол исследования одобрен Этическим комитетом ЦНИИЭ (Протокол № 111 от 22 декабря 2020 г.). Образцы помещали в транспортную среду (ЦНИИЭ, Россия). Выделение РНК из клинического материала производили при помощи комплекта реагентов РИБО-преп («АмплиСенс»); обратную транскрипцию осуществляли с использованием набора РЕВЕРТА-L («АмплиСенс»). Отбирали только те клинические образцы, в которых пороговое число циклов (cycle threshold, Ct) при постановке ПЦР не превышало 20.

В ходе амплификации на приборе T100 Thermal Cycler («BioRad», США) использовали ПЦР-смесь-2 blue («АмплиСенс»), содержащую *Taq*-полимеразу. Далее осуществляли очистку ПЦР-продукта от реакционной смеси посредством реагентов AMPureXP beads («Beckman Coulter», США). Температурный профиль амплификации был следующим: 1) денатурация при 95 °C в течение 30 с; 2) 38 циклов амплификации: 95 °C – 30 с, 60 °C – 20 с, 72 °C – 60 с; 3) финальная элонгация при 72 °C на протяжении 3 мин.

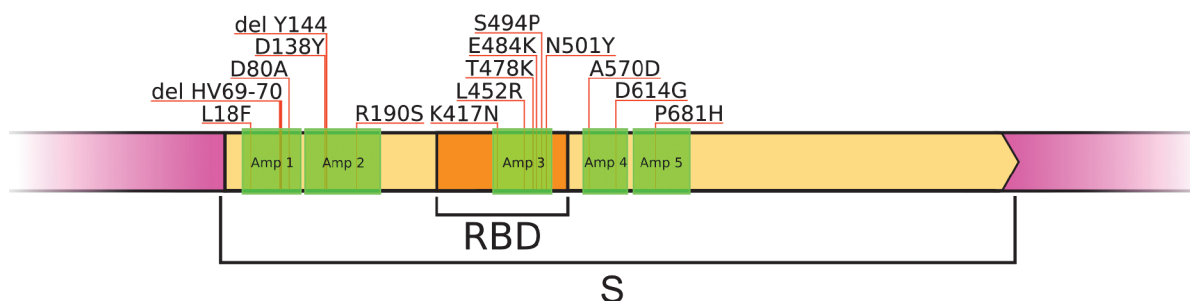


Рис. 1. Локализация ампликонов, получаемых с помощью разработанной панели праймеров, относительно генома SARS-CoV-2.

Примечание. Указан ряд аминокислотных замен и делеций, покрываемых панелью.

Amp 1–5 – ампликоны; S – S-белок; RBD – рецептор-связывающий домен.

Fig. 1. Localization of the amplicons obtained using the primer panel relative to the SARS-CoV-2 virus genome.

Note. Several amino acid substitutions and deletions covered by the panel are indicated.

Amp 1–5, amplicons; S, S-protein; RBD, receptor binding domain.

Индексацию выполняли с использованием ПЦР-смеси-2 blue и EvaGreen («Biotium», США) в качестве красителя на приборе QuantStudio 5 Real-Time PCR System («ThermoFisher Scientific», США). Для этого применяли индекс-праймеры, совместимые с набором реагентов Nextera XT Index Kit v2 (а именно N7xx – 26 возможных вариантов и S5xx – 18 вариантов; подробнее см. «Illumina Adapter Sequences», Document # 1000000002694 v16, April 2021, <https://support-docs.illumina.com/SHARE/AdapterSeq/illumina-adapter-sequences.pdf>). Такое двойное индексирование повышает точность идентификации образцов и позволяет одновременно исследовать большее их количество. Температурный профиль индексации: 1) 98 °C – 30 с; 2) 15 циклов: 98 °C – 10 с, 65 °C – 1 мин 15 с. В дальнейшем образцы повторно очищали от реакционной смеси. Измерение концентрации ДНК проводили на флуориметре Qubit 4.0 («ThermoFisher Scientific»). Образцы собирали в пул эквивалентно концентрациям, после чего осуществляли анализ качества пула при помощи биоанализатора Agilent 2100 («Agilent Technologies», США). Денатурацию и расчёт загрузочной концентрации в прибор проводили согласно инструкциям производителя.

Секвенирование выполняли на платформах Illumina MiSeq («Illumina», США) с использованием реагентов MiSeq Reagent Kit v2 (PE 150 + 150 либо PE 250 + 250 циклов) или MiSeq Reagent Kit v3 (PE 300 + 300 циклов), а также на Illumina HiSeq с применением набора v2 Rapid SBS (PE 250 + 250 циклов). На 1 образец приходилось ~50 тыс. прочтений, что эквивалентно ~0,3% информации, полученной при использовании в процессе секвенирования набора MiSeq Reagent Kit v2 (PE 150 + 150), или ~0,1% – для набора MiSeq Reagent Kit v3 (PE 300 + 300 циклов). Выбранный подход делает возможным исследование без чрезмерных финансовых затрат значительного количества образцов, при этом средняя величина покрытия для большинства из них составляет ≥ 2000 .

Панель праймеров для таргетной амплификации фрагментов гена S-белка подбирали вручную с учётом имеющейся информации об известных эпидемиологически значимых мутациях, а также сведений о консервативных областях генома. Температуры плавления олигонуклеотидов и определение степеней взаимодействий между ними определяли посредством инструмента Multiple Primer Analyzer («ThermoFisher Scientific»). С помощью программы BLASTn [22] оценивали специфичность каждой полученной последовательности ко всем известным организмам (в первую очередь человека, генетический материал которого был представлен в пробе в наибольшем количестве), что позволяло исключить неспецифическое взаимодействие праймера с участками ДНК человека и других организмов. Всего создано 5 олигонуклеотидных пар, содержащих также дополнительные адаптерные последовательности, которые необходимы для сокращения времени и стоимости пробоподготовки. Синтез произведён в ООО «НПФ Синтол» (Россия).

Структура праймеров приведена в **таблице**. Длины ампликонов подбирали таким образом, чтобы обеспечивать полное покрытие целевых участков при их высокопроизводительном секвенировании на платформах Illumina MiSeq с наборами реагентов MiSeq v2 (300 циклов), v2 (500 циклов) и v3 (600 циклов), а также Illumina HiSeq с использованием комплекта v2 Rapid SBS (500 циклов).

Для анализа данных секвенирования получаемые прочтения выравнивали на референсный геном коронавируса SARS-CoV-2 в программном обеспечении BWA [23]. Программу BBTools [24] применяли с целью тримминга адаптерных последовательностей в прочтениях. В качестве минимального допустимого покрытия принимали значение 5. Поиск генетических вариантов осуществляли с применением пакета программ GATK [25]. Последовательности, полученные в настоящем исследовании, были загружены в базу данных нуклеотидных последовательностей вируса SARS-CoV-2 и его мутаций VGARus (<https://genome.criie.ru/>).

В целях визуализации молекулы S-белка и создания рисунков применяли программный продукт VMD [26]. Использовали структурную модель S-белка (идентификационный код в банке данных Protein Data Bank (PDB) ID: 7CAB), полученную с помощью криоэлектронной микроскопии [27].

Результаты

Временной промежуток, в течение которого проводилось исследование в Московском регионе, совпал с периодом, когда во всём мире, включая Россию, началось активное распространение вызывающих настороженность штаммов SARS-CoV-2, что могло стать одной из причин новых волн заболеваемости в ряде стран.

Если в изолятах, полученных в феврале 2021 г., найдена лишь весьма небольшая (~2%) доля штамма альфа, то в марте его представленность возросла до ~20%, что вполне согласуется с данными о повышенной контагиозности этого штамма [28]. Однако в дальнейшем широкого распространения его не зарегистрировано, и эта величина постепенно снижалась, упав в середине июня практически до нуля. С наибольшей вероятностью это вызвано появлением в мае этого же года в РФ штамма дельта, ранее, возможно, ставшего причиной повышенных показателей заболеваемости и смертности среди населения Индии. К середине июня 2021 г. представленность данного штамма также резко выросла на территории Москвы (до 70%) и по данным, не вошедшим в представляемое исследование, с этого времени продолжает увеличиваться вплоть до >90%. Кроме того, в конце июня текущего года отмечены случаи заболевания штаммом дельта-плюс с дополнительной заменой K417N [29], встречавшейся ранее в штамме бета и находящейся также в одном из участков генома SARS-CoV-2, амплифицируемых при помощи разработанной праймерной панели (**рис. 2**).

Примечательно, что значительного распространения варианта бета на территории Москвы зарегистрирова-

но не было, хотя в апреле 2021 г. его доля быстро увеличилась до 13%, что вызвало определённую обеспокоенность среди населения. Это имело в своей основе сведения о том, что указанный штамм нового коронавируса частично избегает нейтрализующего действия АТ, выработавшихся вследствие как перенесённой ранее коронавирусной инфекции, так и вакцинации [30].

Помимо этого, следует отметить штамм В.1.1.523, представленность которого существенно выросла к маю 2021 г. Наличие у него мутации E484K указывало, что он (как и штамм бета) может быть более устойчив к воздействию АТ. Кроме того, этот вариант имеет изменения в S-белке – S494P и делецию 3 аминокислот. Впрочем, его доля тоже резко упала в июне этого же года, когда превалирующим стал вариант дельта. При этом нами не обнаружено случаев заболеваний, вызванных штаммом гамма (бразильский).

На **рис. 2** показана также динамика представленности вариантов вируса, имеющих мутации N501Y или E484K, но не отнесённых к какому-либо из указанных штаммов в силу отсутствия других необходимых для этого изменений в геноме.

Диаграммы на **рис. 3** показывают изменение частот распространённости отдельных мутаций, которые были показаны ранее как изменяющие свойства вируса и приводящие к повышенной трансмиссивности либо избеганию защитного действия АТ. Так, в феврале 2021 г. почти 15% всех изолятов содержали мутацию E484K, хотя на тот момент несущий эту замену штамм бета ещё не был обнаружен на территории России. Этот феномен

свидетельствует о том, что хотя подобное изменение в геноме может предоставлять патогену определённые преимущества, однако без других важных мутаций, значимые комбинации которых часто не ясны, оно не всегда ведёт к широкому распространению возбудителя. Последующие же месяцы отмечены ростом частоты нескольких мутаций, в том числе E484K, N501Y, S494P. В апреле 2021 г. за счёт появления в РФ штамма бета зарегистрировано повышение частоты мутации K417N, которая имеется также в варианте дельта-плюс, впервые обнаруженном на территории Российской Федерации лишь в конце июня этого же года. Наконец, мутации L452R и T478K, принадлежащие штамму дельта, появились в мае 2021 г. и сейчас присутствуют в подавляющем большинстве геномов SARS-CoV-2.

Представленные данные показывают, что применение небольшой праймерной панели для амплификации фрагментов генома нового коронавируса и последующего таргетного секвенирования позволяет выявлять практически все известные значимые изменения в гене S-белка коронавируса и идентифицировать штаммы возбудителя, делая возможным отслеживание их частоты (представленности) в определённые промежутки времени. В то же время необходимо подчеркнуть, что далеко не всегда отдельные мутации приводят к возникновению более контагиозного и эпидемиологически опасного варианта вируса и лишь сочетания мутационных изменений способны придавать новые свойства патогену, иногда обуславливая его широкое распространение.

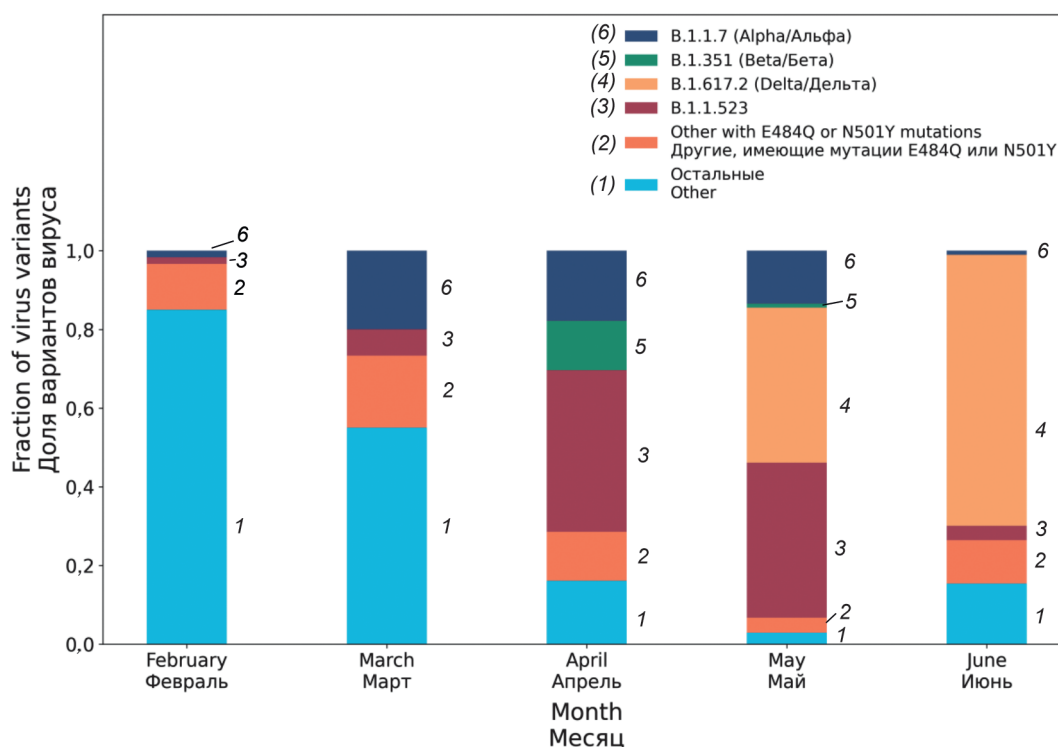


Рис. 2. Представленность различных вариантов вируса SARS-CoV-2 с февраля по июнь 2021 г. на территории Москвы и Московской области.

Fig. 2. Representation of various variants of SARS-CoV-2 from February to June 2021 in Moscow and the Moscow Region.

Обсуждение

В этой методологической работе мы описали возможность выявления ряда штаммов SARS-CoV-2, включая варианты альфа (британский, B.1.1.7), бета (южноафриканский, B.1.351), гамма (бразильский, P.1), дельта (индийский, B.1.617.2), с помощью таргетного высокопроизводительного секвенирования нового (следующего) поколения. Для этих целей нами разработана праймерная панель (таблица), позволяющая эффективно проводить целевую амплификацию геномных фрагментов нового коронавируса. Амплифицируемые участки включают большое число известных важных мутаций, изменяющих свойства

вируса, что позволяет кардинально снизить расходы на секвенирование и исследовать большее количество образцов. Последнее вполне оправдано, если необходимо именно выявление значимых изменений в гене S-белка для определения принадлежности изолятов вируса к различным штаммам. Чтобы продемонстрировать использование праймерной панели на практике, мы провели также исследование 579 случайных образцов SARS-CoV-2, отобранных на протяжении февраля–июня 2021 г. у пациентов Москвы и Московской области. Представляется важным, что большинство важных изменений в гене S-белка локализованы в ряде небольших его фрагментов, кодирующих в ос-

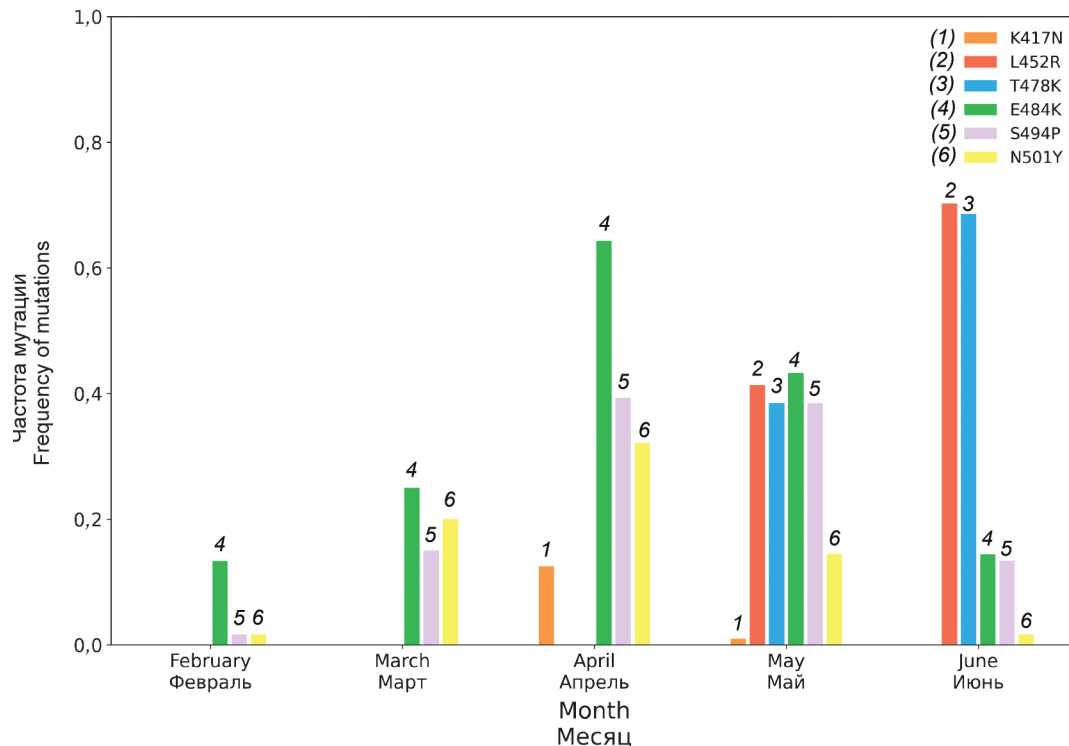


Рис. 3. Частота отдельных мутаций вируса SARS-CoV-2 в разные месяцы 2021 г. на территории Москвы и Московской области.
 Fig. 3. Frequency of individual SARS-CoV-2 mutations in different months of 2021 in Moscow and the Moscow Region.

Последовательности олигонуклеотидов в праймерной панели Sequences of oligonucleotides in the primer panel

Идентификатор олигонуклеотида Oligonucleotide ID	Последовательность олигонуклеотида Oligonucleotide sequence
F1	5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG-TGT TTT TCT TGT TTT ATT GCC ACT AGT CTC-3'
R1	5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA G-TC TTA TGT TAG ACT TCT CAG TGG AAG CA-3'
F2	5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG-GCT GGA TTT TTG GTA CTA CTT TAG ATT CG-3'
R2	5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA G-AA TCT ACC AAT GGT TCT AAA GCC GAA AAA C-3'
F3	5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG-GCT CCA GGG CAA ACT GGA AA-3'
R3	5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA G-CT GTA TGG TTG GTA ACC AAC ACC AT-3'
F4	5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG-CCA ACA ATT TGG CAG AGA CAT TG-3'
R4	5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA G-CGC CAA GTA GGA GTA AGT TGA TCT G-3'
F5	5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG-AAA CAC GTG CAG GCT GTT TAA TAG G-3'
R5	5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA G-CT ACT GAT GTC TTG GTC ATA GAC ACT GG-3'

Примечание. Специфические фрагменты отделены от адаптеров символом «-».

Note. Specific fragments are separated from adapters with a «-» symbol.

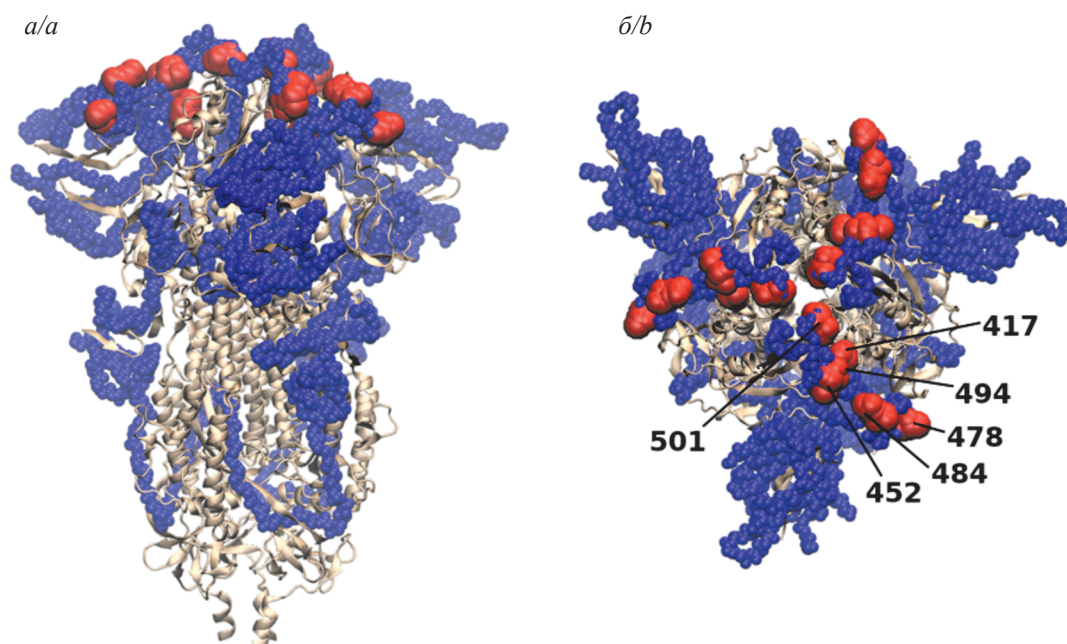


Рис. 4. Структурная модель S-белка, полученная с использованием криоэлектронной микроскопии (PDB ID: 7CAB). *a)* – вид сбоку, *б)* – вид сверху.

Примечание. Числами от 417 до 501 обозначены аминокислотные остатки в соответствующих позициях. Регионы, вошедшие в праймерную панель, подсвечены синим цветом и показаны в виде небольших сфер. Значимые мутации (K417T, L452R, T478K, E484K, S494P, N501Y) показаны красным цветом как сферы большего диаметра и указаны на рисунке (*б*).

Fig. 4. Structural model of S-protein obtained using cryo-electron microscopy (PDB ID: 7CAB). View from the side (*a*) and from above (*b*).

Note. The numbers from 417 to 501 indicate the amino acid residues in the corresponding positions. The regions included in the primer panel are highlighted in blue and shown as small spheres. Significant mutations (K417T, L452R, T478K, E484K, S494P, N501Y) are shown in red as larger spheres and are indicated in figure (*b*).

новном расположенные на поверхности аминокислоты (**рис. 4**). Настоящая работа дополнительно иллюстрирует необходимость активизации популяционных, геномных и эпидемиологических исследований по выявлению, отслеживанию распространения и мониторингу новых вариантов вирусных патогенов.

Мы показали быстрое изменение доли различных генетических вариантов возбудителя COVID-19 в указанный период, включая появление и активное распространение на территории Москвы и Московской области на протяжении мая–июня 2021 г. штамма дельта, потенциально частично ответственного за новую волну заболевания в Москве летом текущего года. Тем не менее пренебрежение со стороны населения мерами социального дистанцирования, индивидуальной защиты и низкий уровень вакцинации также играют важнейшую роль в распространении инфекции. Таким образом, проделанная работа дополнительно иллюстрирует необходимость активизации популяционных, геномных и эпидемиологических исследований по выявлению, отслеживанию распространения и мониторингу как новых вариантов SARS-CoV-2, так и других вирусных агентов, характеризующихся повышенной изменчивостью.

Хотя нельзя исключить, что новые значимые геномные варианты затронут другие важные фрагменты генетического материала вируса, использование панели с небольшим количеством праймеров обеспечивает

кардинальное сокращение затрат на выявление циркулирующих в настоящее время штаммов, а простой дизайн позволяет быстро изменять структуру олигонуклеотидов с учётом постоянно появляющейся новой информации о геномах. Следует отдельно отметить, что таргетное секвенирование не может полностью заменить полногеномное, позволяющее выявлять все изменения в геноме и проводить детальный филогенетический анализ. Для подробного биоинформатического анализа специалисты могут обратиться к недавно созданной базе данных геномов коронавируса VGARus, в которой на конец июня 2021 г. уже содержалось ~15 тыс. последовательностей, включая ~8 тыс. полных геномов, которые получены секвенированием собранных в различных регионах РФ изолятов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020; 579(7798): 270–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
2. COVID-19 data in motion. Available at: <https://coronavirus.jhu.edu> (accessed July 24, 2021).
3. Chen P., Nirula A., Heller B., Gottlieb R.L., Boscia J., Morris J., et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibody LY-CoV555 in outpatients with Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 2021; 384(3): 229–37. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2029849>
4. Weinreich D.M., Sivapalasingam S., Norton T., Ali S., Gao H., Bhoire R., et al. REGN-COV2, a neutralizing antibody cocktail, in outpatients with Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 2021; 384(3): 238–51. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2035002>

5. Baden L.R., El Sahly H.M., Essink B., Kotloff K., Frey S., Novak R., et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2021; 384(5): 403–16. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2035389>
6. Polack F.P., Thomas S.J., Kitchin N., Absalon J., Gurtman A., Lockhart S., et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2020; 383(27): 2603–15. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2034577>
7. Jones I., Roy P. Sputnik V COVID-19 vaccine candidate appears safe and effective. *Lancet.* 2021; 397(10275): 642–3. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)00191-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)00191-4)
8. Рыжиков А.Б., Рыжиков Е.А., Богрянцева М.П., Усова С.В., Даниленко Е.Д., Нечаева Е.А., и др. Простое слепое плацебо-контролируемое рандомизированное исследование безопасности, реактогенности и иммуногенности вакцины «ЭпиВакКорона» для профилактики COVID-19 на добровольцах в возрасте 18–60 лет (фаза I–II). *Инфекция и иммунитет.* 2021; 11(2): 283–96. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-ASB-1699>
9. About Variants of the Virus that Causes COVID-19. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/Transmission/variant.html> (accessed July 26, 2021).
10. Wang W.B., Liang Y., Jin Y.Q., Zhang J., Su J.G., Li Q.M. E484K mutation in SARS-CoV-2 RBD enhances binding affinity with hACE2 but reduces interactions with neutralizing antibodies and nanobodies: binding free energy calculation studies. *bioRxiv.* 2021; Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.02.17.431566>
11. Garcia-Beltran W.F., Lam E.C., St. Denis K., Nitido A.D., Garcia Z.H., Hauser B.M., et al. Circulating SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. *medRxiv.* 2021; Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.02.14.21251704>
12. Liu H., Wei P., Zhang Q., Chen Z., Aviszus K., Downing W., et al. 501Y.V2 and 501Y.V3 variants of SARS-CoV-2 lose binding to bamlanivimab *in vitro*. *MAbs.* 2021; 13(1): 1919285. <https://doi.org/10.1080/19420862.2021.1919285>
13. Yuan M., Huang D., Lee C.D., Wu N.C., Jackson A.M., Zhu X., et al. Structural and functional ramifications of antigenic drift in recent SARS-CoV-2 variants. *Science.* 2021; eabh1139. <https://doi.org/10.1126/science.abh1139>
14. Ikegame S., Siddiquey M.N.A., Hung C.-T., Haas G., Brambilla L., Oguntuyo K.Y., et al. Neutralizing activity of Sputnik V vaccine sera against SARS-CoV-2 variants. *medRxiv.* 2021.03.31.21254660. doi: <https://doi.org/10.1101/2021.03.31.21254660>
15. Gard N., Buzko O., Spilman P., Niazi K., Rabizadeh S., Soon-Shiong P. Molecular dynamic simulation reveals E484K mutation enhances spike RBD-ACE2 affinity and the combination of E484K, K417N and N501Y mutations (501Y.V2 variant) induces conformational change greater than N501Y mutant alone, potentially resulting in an escape mutant *bioRxiv.* 2021.01.13.426558. doi: <https://doi.org/10.1101/2021.01.13.426558>
16. Tian F., Tong B., Sun L., Shi S., Zheng B., Wang Z., et al. Mutation N501Y in RBD of spike protein strengthens the interaction between COVID-19 and its receptor ACE2. *bioRxiv.* 2021; Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.02.14.431117>
17. Хафизов К.Ф., Петров В.В., Красовитов К.В., Золкина М.В., Акимкин В.Г. Экспресс-диагностика новой коронавирусной инфекции с помощью реакции петлевой изотермической амплификации. *Вопросы вирусологии.* 2021; 66(1): 17–28. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-42>
18. Gladkikh A., Dolgova A., Dedkov V., Sbarzaglia V., Kanaeva O., Popova A., et al. Characterization of a novel SARS-CoV-2 genetic variant with distinct spike protein mutations. *Viruses.* 2021; 13(6): 1029. <https://doi.org/10.3390/v13061029>
19. Klink G.V., Safina K.R., Garushyants S.K., Moldovan M., Nabitva E., Komissarov A.B., et al. Spread of endemic SARS-CoV-2 lineages in Russia. *medRxiv.* 2021; Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.05.25.21257695>
20. Komissarov A.B., Safina K.R., Garushyants S.K., Fadeev A.V., Sergeeva M.V., Ivanova A.A., et al. Genomic epidemiology of the early stages of the SARS-CoV-2 outbreak in Russia. *Nat. Commun.* 2021; 12(1): 649. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20880-z>
21. Long S.W., Olsen R.J., Christensen P.A., Subedi S., Olson R., Davis J.J., et al. Sequence Analysis of 20,453 Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Genomes from the Houston Metropolitan Area Identifies the Emergence and Widespread Distribution of Multiple Isolates of All Major Variants of Concern. *Am. J. Pathol.* 2021; 191(6): 983–92. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2021.03.004>
22. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990; 215(3): 403–10. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2)
23. Li H., Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009; 25(14): 1754–60. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
24. Bushnell B., Rood J., Singer E. BBMerge – Accurate paired shotgun read merging via overlap. *PLoS One.* 2017; 12(10): e0185056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185056>
25. Poplin R., Ruano-Rubio V., DePristo M.A., Fennell T.J., Carneiro M.O., Van der Auwera G.A., et al. Scaling accurate genetic variant discovery to tens of thousands of samples. *bioRxiv.* 2018; 2011178. doi: <https://doi.org/10.1101/2011178>
26. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 1996; 14(1): 33–8. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
27. Lv Z., Deng Y.Q., Ye Q., Cao L., Sun C.Y., Fan C., et al. Structural basis for neutralization of SARS-CoV-2 and SARS-CoV by a potent therapeutic antibody. *Science.* 2020; 369(6510): 1505–9. <https://doi.org/10.1126/science.abc5881>
28. Davies N.G., Abbott S., Barnard R.C., Jarvis C.I., Kucharski A.J., Munday J.D., et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science.* 2021; 372(6538): eabg3055. <https://doi.org/10.1126/science.abg3055>
29. Expert comment on the ‘Delta plus’ variant (B.1.617.2 with the addition of K417N mutation). Available at: <https://www.sciencemediacentre.org/expert-comment-on-the-delta-plus-variant-b-1-617-2-with-the-addition-of-k417n-mutation/> (accessed July 26, 2021).
30. Weekly epidemiological update on COVID-19 – 22 June 2021. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---22-june-2021> (accessed July 24, 2021).

REFERENCES

1. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020; 579(7798): 270–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
2. COVID-19 data in motion. Available at: <https://coronavirus.jhu.edu> (accessed July 24, 2021).
3. Chen P., Nirula A., Heller B., Gottlieb R.L., Boscia J., Morris J., et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibody LY-CoV555 in outpatients with Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 2021; 384(3): 229–37. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2029849>
4. Weinreich D.M., Sivapalasingam S., Norton T., Ali S., Gao H., Bhoire R., et al. REGN-COV2, a neutralizing antibody cocktail, in outpatients with Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 2021; 384(3): 238–51. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2035002>
5. Baden L.R., El Sahly H.M., Essink B., Kotloff K., Frey S., Novak R., et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2021; 384(5): 403–16. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2035389>
6. Polack F.P., Thomas S.J., Kitchin N., Absalon J., Gurtman A., Lockhart S., et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2020; 383(27): 2603–15. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2034577>
7. Jones I., Roy P. Sputnik V COVID-19 vaccine candidate appears safe and effective. *Lancet.* 2021; 397(10275): 642–3. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)00191-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)00191-4)
8. Ryzhikov A.B., Ryzhikov E.A., Bogryantseva M.P., Usova S.V., Dаниленко Е.Д., Нечаева Е.А., et al. A single blind, placebo-controlled randomized study of the safety, reactogenicity and immunogenicity of the “EpiVacCorona” vaccine for the prevention of COVID-19, in volunteers aged 18–60 years (phase I–II) [*Prostoe slepoe plasebo-kontroliruemoe randomizirovannoe issledovanie bezopasnosti, reaktogenosti i immunogenosti vaksiny «EpiVak-Korona» dlya profilaktiki COVID-19 na dobrovol'tsakh v vozraste 18–60 let (faza I–II)*]. *Infektsiya i immunitet.* 2021; 11(2): 283–96. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-ASB-1699> (in Russian)
9. About Variants of the Virus that Causes COVID-19. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/Transmission/variant.html> (accessed July 26, 2021).

10. Wang W.B., Liang Y., Jin Y.Q., Zhang J., Su J.G., Li Q.M. E484K mutation in SARS-CoV-2 RBD enhances binding affinity with hACE2 but reduces interactions with neutralizing antibodies and nanobodies: binding free energy calculation studies. *bioRxiv*. 2021; Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.02.17.431566>
11. Garcia-Beltran W.F., Lam E.C., St. Denis K., Nitido A.D., Garcia Z.H., Hauser B.M., et al. Circulating SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. *medRxiv*. 2021; Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.02.14.21251704>
12. Liu H., Wei P., Zhang Q., Chen Z., Aviszus K., Downing W., et al. 501Y.V2 and 501Y.V3 variants of SARS-CoV-2 lose binding to bamlanivimab *in vitro*. *MAbs*. 2021; 13(1): 1919285. <https://doi.org/10.1080/19420862.2021.1919285>
13. Yuan M., Huang D., Lee C.D., Wu N.C., Jackson A.M., Zhu X., et al. Structural and functional ramifications of antigenic drift in recent SARS-CoV-2 variants. *Science*. 2021; eabh1139. <https://doi.org/10.1126/science.abh1139>
14. Ikegame S., Siddiquey M.N.A., Hung C.-T., Haas G., Brambilla L., Oguntuyo K.Y., et al. Neutralizing activity of Sputnik V vaccine sera against SARS-CoV-2 variants. *medRxiv*. 2021.03.31.21254660. doi: <https://doi.org/10.1101/2021.03.31.21254660>
15. Gard N., Buzko O., Spilman P., Niazi K., Rabizadeh S., Soon-Shiong P. Molecular dynamic simulation reveals E484K mutation enhances spike RBD-ACE2 affinity and the combination of E484K, K417N and N501Y mutations (501Y.V2 variant) induces conformational change greater than N501Y mutant alone, potentially resulting in an escape mutant *bioRxiv*. 2021.01.13.426558. doi: <https://doi.org/10.1101/2021.01.13.426558>
16. Tian F., Tong B., Sun L., Shi S., Zheng B., Wang Z., et al. Mutation N501Y in RBD of spike protein strengthens the interaction between COVID-19 and its receptor ACE2. *bioRxiv*. 2021; Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.02.14.431117>
17. Khafizov K.F., Petrov V.V., Krasovtsov K.V., Zolkina M.V., Akimkin V.G. Rapid diagnostics of novel coronavirus infection by loop-mediated isothermal amplification [*Ekspress-diagnostics novoy koronavirusnoy infektsii s pomoshch'yu reaktsii petlevoy izotermicheskoy amplifikatsii*]. *Voprosy virusologii*. 2021; 66(1): 17–28. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-42> (in Russian)
18. Gladkikh A., Dolgova A., Dedkov V., Sbarzaglia V., Kanaeva O., Popova A., et al. Characterization of a novel SARS-CoV-2 genetic variant with distinct spike protein mutations. *Viruses*. 2021; 13(6): 1029. <https://doi.org/10.3390/v13061029>
19. Klink G.V., Safina K.R., Garushyants S.K., Moldovan M., Nabeieva E., Komissarov A.B., et al. Spread of endemic SARS-CoV-2 lineages in Russia. *medRxiv*. 2021; Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.05.25.21257695>
20. Komissarov A.B., Safina K.R., Garushyants S.K., Fadeev A.V., Sergeeva M.V., Ivanova A.A., et al. Genomic epidemiology of the early stages of the SARS-CoV-2 outbreak in Russia. *Nat. Commun*. 2021; 12(1): 649. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20880-z>
21. Long S.W., Olsen R.J., Christensen P.A., Subedi S., Olson R., Davis J.J., et al. Sequence Analysis of 20,453 Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Genomes from the Houston Metropolitan Area Identifies the Emergence and Widespread Distribution of Multiple Isolates of All Major Variants of Concern. *Am. J. Pathol*. 2021; 191(6): 983–92. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2021.03.004>
22. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol*. 1990; 215(3): 403–10. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2)
23. Li H., Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009; 25(14): 1754–60. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
24. Bushnell B., Rood J., Singer E. BBMerge – Accurate paired shotgun read merging via overlap. *PLoS One*. 2017; 12(10): e0185056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185056>
25. Poplin R., Ruano-Rubio V., DePristo M.A., Fennell T.J., Carneiro M.O., Van der Auwera G.A., et al. Scaling accurate genetic variant discovery to tens of thousands of samples. *bioRxiv*. 2018; 201178. doi: <https://doi.org/10.1101/201178>
26. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph*. 1996; 14(1): 33–8, 27–8. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
27. Lv Z., Deng Y.Q., Ye Q., Cao L., Sun C.Y., Fan C., et al. Structural basis for neutralization of SARS-CoV-2 and SARS-CoV by a potent therapeutic antibody. *Science*. 2020; 369(6510): 1505–9. <https://doi.org/10.1126/science.abc5881>
28. Davies N.G., Abbott S., Barnard R.C., Jarvis C.I., Kucharski A.J., Munday J.D., et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science*. 2021; 372(6538): eabg3055. <https://doi.org/10.1126/science.abg3055>
29. Expert comment on the 'Delta plus' variant (B.1.617.2 with the addition of K417N mutation). Available at: <https://www.sciencemediacentre.org/expert-comment-on-the-delta-plus-variant-b-1-617-2-with-the-addition-of-k417n-mutation/> (accessed July 26, 2021).
30. Weekly epidemiological update on COVID-19 – 22 June 2021. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---22-june-2021> (accessed July 24, 2021).