

Геномное секвенирование SARS-CoV-2 для целей общественного здравоохранения

Временные рекомендации

8 января 2021 г.



Всемирная организация
здравоохранения

Ключевые положения

- Глобальный мониторинг изменений генетической структуры вируса SARS-CoV-2 и связанных с ними метаданных является важным компонентом реагирования на вспышку COVID-19. Эта работа включает в себя отслеживание географического распространения SARS-CoV-2 с течением времени и обеспечение своевременного выявления и оценки мутаций, которые потенциально могут влиять на патогенность, передачу инфекции или применение контрмер (такие как вакцины, а также средства лечения и диагностики).
- Хотя стоимость и сложность генетического секвенирования со временем значительно снизились, эффективные программы секвенирования по-прежнему требуют значительных ресурсов – персонала, оборудования, реагентов и биоинформационной инфраструктуры. Кроме того, залогом высокого качества и оптимального использования получаемых данных является эффективное сотрудничество различных служб.
- Странам рекомендуется оперативно вносить генетические последовательности SARS-CoV-2 в открытую базу данных для информирования научного сообщества в интересах общественного здравоохранения. Вложение средств в создание многоуровневой глобальной сети секвенирования SARS-CoV-2 будет способствовать реализации устойчивых, высококачественных глобальных программ секвенирования, направленных на выявление и контроль других возбудителей инфекционных вспышек в будущем.

Справочная информация

За последнее десятилетие данные о геномных последовательностях (ДГП) различных патогенных микроорганизмов, используемые в создании лечебно-диагностических препаратов и вакцин, а также для обоснования противоэпидемических мер, стали играть ключевую роль в выявлении и ликвидации вспышек инфекционных болезней (1–11). Важность ДГП стала еще более явной с появлением нового коронавируса, получившего название «коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2)». В течение года после первоначальной идентификации SARS-CoV-2 в публичные базы данных было внесено более 280 000 полных геномных последовательностей этого вируса (12). Анализ получаемых данных, проводимый практически в режиме реального времени, оказывает непосредственное влияние на принимаемые меры общественного здравоохранения (12–16). В таблице 1 описаны задачи геномного секвенирования SARS-CoV-2 для нужд общественного здравоохранения.

Растущее понимание того, как информация о геномных последовательностях может способствовать улучшению показателей здоровья населения, стимулирует глобальные инвестиции в инфраструктуру и программы секвенирования. Растущее удешевление и упрощение методов получения ДГП открывает возможности для наращивания потенциала секвенирования. Вместе с тем сохраняются проблемы с широким внедрением, а потенциал секвенирования и данные распределяются неравномерно – избыточно представлены ДГП по SARS-CoV-2 из стран с высоким уровнем дохода.

Таблица 1. Задачи геномного секвенирования SARS-CoV-2 для нужд общественного здравоохранения

Малозатратные мероприятия, после выполнения которых повторное секвенирование либо не требуется, либо проводится в разовом порядке в рамках последующего наблюдения	Мероприятия, требующие систематического проведения секвенирования в течение более длительного периода	
<ul style="list-style-type: none"> - Идентификация SARS-CoV-2 как возбудителя болезни. - Создание тестов на SARS-CoV-2. - Поддержка разработки лечебных препаратов и вакцин. - Установление времени появления SARS-CoV-2 в качестве возбудителя инфекции человека и исследование его происхождения (текущая деятельность). - Реинфекция: <ul style="list-style-type: none"> • оценка и углубление понимания данного феномена; • на индивидуальном уровне – дифференциальный диагноз между затяжной инфекцией и реинфекцией. 	<p>Эволюция SARS-CoV-2 и ее влияние на:</p> <ul style="list-style-type: none"> - сдвиги в поведении вируса (фенотипические изменения), например изменения трансмиссивности или патогенности; - иммунитет (как результат вакцинации или перенесенной инфекции); - действие средств диагностики (молекулярные, серологические и антигенные тесты); - терапевтические вмешательства (например, применение моноклональных антител). 	<p>Мониторинг распространения и активности вируса:</p> <ul style="list-style-type: none"> - изучение географического распространения и реинтродукции между популяциями; - расследование вспышек в конкретных условиях и среди определенных групп (например, в больницах); - мониторинг зоонозной реинтродукции в обоих направлениях с преодолением межвидовых барьеров; - мониторинг природной водной среды и сточных вод; - поддержка процессов традиционного эпиднадзора: расчет периода передачи и оценка движущих факторов, а также определение уровня передачи в популяции.

Предназначение настоящего документа

В документе представлены рекомендации для директивных органов и заинтересованных сторон на национальном уровне о том, как получить максимальную пользу для общественного здравоохранения от мероприятий по секвенированию генома SARS-CoV-2 в краткосрочной и долгосрочной перспективе по мере развития пандемии. Рассмотрены практические соображения по реализации программы секвенирования генома вируса, и приведен обзор задач секвенирования для нужд общественного здравоохранения. Руководство сосредоточено на SARS-CoV-2, но применимо и к другим патогенам. Странам, желающим расширить свои возможности для секвенирования SARS-CoV-2, рекомендуется включить эту работу в более широкий план создания потенциала для выявления и мониторинга других патогенов, имеющих значение для общественного здравоохранения.

Дополнительное руководство ВОЗ

Специалисты ВОЗ в сотрудничестве с экспертами по секвенированию из различных стран мира разработали руководство [Genomic sequencing of SARS-CoV-2: a guide to implementation for maximum impact on public health](#) (Геномное секвенирование SARS-CoV-2: практическое руководство для обеспечения максимального позитивного воздействия на общественное здравоохранение). Оно содержит более полную информацию о секвенировании SARS-CoV-2 и предназначено для тех, кто активно участвует в реализации программ секвенирования (17). В руководстве приведен углубленный обзор различных вариантов применения секвенирования и даются технические рекомендации по секвенированию патогенов в контексте SARS-CoV-2. Помимо использования этих и других опубликованных документов, лаборатории с ограниченным опытом секвенирования должны активно искать возможности для сотрудничества с более опытными лабораториями, а также присоединяться к лабораторным сетям, обладающим необходимой экспертизой в данной области.

1. Основные сведения о SARS-CoV-2

Вирус SARS-CoV-2 принадлежит к роду *Betacoronavirus* (подрод *Sarbecovirus*) семейства *Coronaviridae* (18). Это оболочечный вирус с положительно направленной одноцепочечной молекулой рибонуклеиновой кислоты (РНК) с размером генома примерно 30 Кб (19). Генетическое секвенирование позволяет считывать вирусные геномы. Поскольку каждый патоген имеет уникальную геномную последовательность, этот метод может быть использован для идентификации новых патогенов (как в случае SARS-CoV-2) (20). Геном SARS-CoV-2 кодирует неструктурные белки, четыре структурных белка (спайковый [S], оболочечный [E], мембранный [M], нуклеокапсидный [N]), а также ряд предполагаемых вспомогательных белков (21–23). Внедрение SARS-CoV-2 в клетку хозяина требует связывания вирусного белка S с рецептором ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE-2) клетки-хозяина (24–27). Спайковый белок SARS-CoV-2, особенно его рецептор-связывающий домен (RBD), является критической мишенью для естественного и вакцинно-индуцированного иммунитета (28–32). Таким образом, диверсификация гена, кодирующего

спайковый белок, потенциально может повлиять на свойства вакцины, естественный иммунитет и эффективность терапии с применением моноклональных антител (33).

В процессе репликации вирусов, особенно РНК-вирусов, таких как SARS-CoV-2, в их геноме происходят изменения (мутации). Если произошедшая мутация не имеет эволюционных дефектов, она может закрепиться в популяциях вируса. Скорость эволюционных изменений в SARS-CoV-2 в настоящее время оценивается как 1×10^{-3} замены на сайт в год на нуклеотидном уровне (34). Это соответствует примерно одной замене в геноме каждые две недели (35). Данная, относительно низкая скорость эволюции ограничивает временные параметры отдельных событий передачи (35). Изучение эволюции SARS-CoV-2 и оперативное выявление замен, вставок или делеций, которые могут повлиять на свойства вируса (фенотипические изменения), является важным инструментом эпидемиологического мониторинга. Одним из наиболее очевидных результатов такой работы является обнаружение мутаций, которые коррелируют с изменением трансмиссивности и/или патогенности вируса или могут снизить эффективность медицинских контрагентов (лечебно-диагностических средств и вакцин). Мониторинг мутаций вируса во времени и пространстве также может помочь отслеживать распространение патогена и способствовать формированию более полного представления о потенциальных путях и динамике передачи инфекции. Реконструкция эволюционной истории патогенов осуществляется с помощью филогенетического анализа. Филогенетический и филодинамический анализ (изучение филогении вируса под воздействием эпидемиологических и эволюционных процессов) может дать обширную информацию для обоснования мер реагирования на вспышки.

2. Определение оптимального подхода к секвенированию SARS-CoV-2 в местном контексте

2.1 Контекстно-ориентированная приоритизация задач и стратегий секвенирования

Хотя за последние десятилетия стоимость секвенирования генов значительно снизилась, эта работа по-прежнему требует значительных ресурсов (финансовых, инфраструктурных и кадровых). Прежде чем приступить к осуществлению проекта секвенирования, крайне важно определить, действительно ли такое исследование необходимо для достижения конкретной цели либо для этого существуют другие подходы, более экономные в отношении затрат времени и ресурсов. В процессе принятия решения можно также рассмотреть вопрос о том, достаточно ли для достижения поставленной цели лишь провести секвенирование вируса либо оно должно быть включено в качестве компонента междисциплинарного подхода. Эпидемиологически ориентированные мероприятия, в осуществлении которых участвуют аналитики геномных данных в качестве членов групп по расследованию и реагированию в области общественного здравоохранения, скорее всего, окажутся более эффективными, чем те, в которых анализ генома вируса занимает отдельное или второстепенное место.

В условиях недостатка ресурсов для проведения секвенирования может возникнуть необходимость сузить задачи программы, предусмотрев лишь стабильно осуществимые процессы с достаточно высоким клиническим потенциалом и/или пользой для общественного здравоохранения. Речь может идти об осуществлении в приоритетном порядке секвенирования SARS-CoV-2 в следующих ситуациях: (i) развитие инфекции у лиц, которые ранее были вакцинированы и демонстрировали адекватный иммунный ответ; (ii) наличие высокого риска, например в условиях тесного контакта людей с большим числом животных, восприимчивых к SARS-CoV-2, или при длительном выделении вируса у пациентов с ослабленным иммунитетом, особенно получающих антитела против SARS-CoV-2; (iii) неожиданное повышение или иное изменение трансмиссивности и/или вирулентности SARS-CoV-2; (iv) подозрение на изменение эффективности диагностических тестов (таких, как тесты на антитела или на антиген, молекулярные анализы) или методов лечения; (v) во время расследований кластеров, когда секвенирование может помочь в анализе передачи инфекции и/или в оценке эффективности процедур инфекционного контроля.

На рисунке 1 представлен обзор основных элементов, необходимых для секвенирования. Если по всем трем основным элементам имеется ограниченный потенциал или он полностью отсутствует, то, скорее всего, для достижения целей секвенирования потребуется наладить партнерские отношения с другими функциональными подразделениями. И наоборот, при наличии достаточного потенциала и ресурсов для одного или нескольких элементов лаборатория могла бы рассмотреть вопрос о поддержке других партнеров

в создании программ секвенирования. На различных этапах развития вспышки спрос на функциональные ресурсы может меняться, что потребует от лабораторий перехода от одной стратегии к другой.

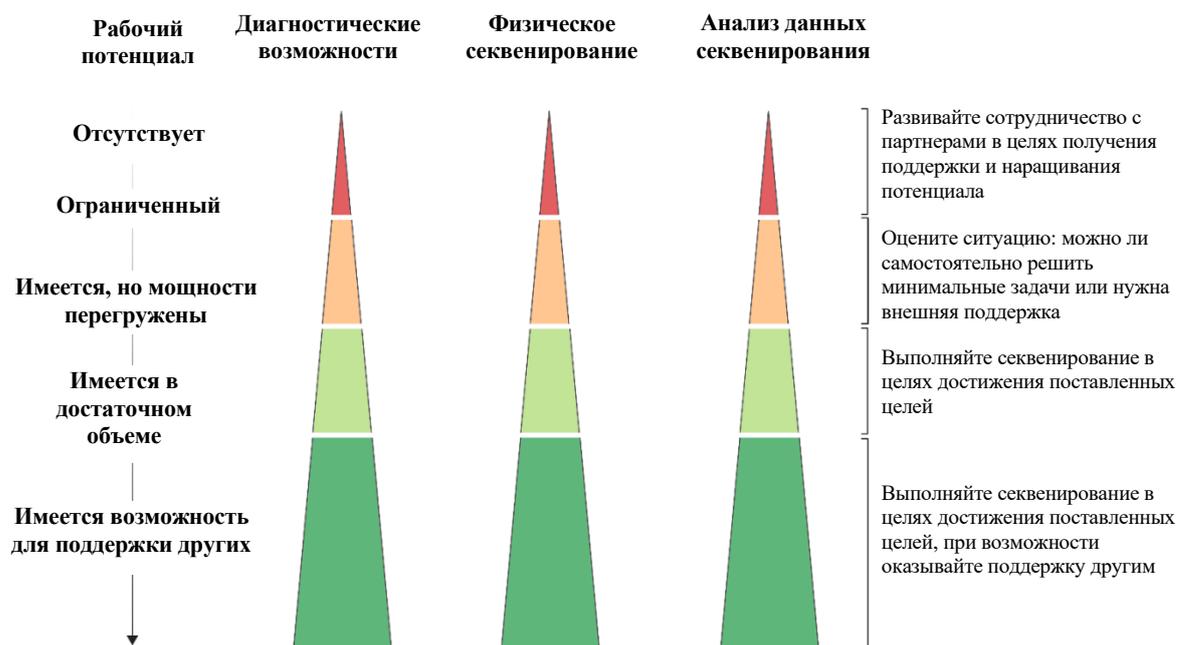


Рисунок 1. Оценка потенциала по основным элементам, необходимым для секвенирования, с целью выбора оптимального подхода к планированию программы

2.2 Вложение ресурсов в создание устойчивого глобального потенциала секвенирования SARS-CoV-2 и других (новых / вновь появляющихся) патогенов, имеющих значение для общественного здравоохранения

Многоуровневые лабораторные сети ВОЗ доказали свою функциональность и являются надежным механизмом глобального сотрудничества с обеспечением адаптации местных сетей к конкретным национальным и региональным потребностям (36–39). Создание настолько же сильной и устойчивой глобальной сети секвенирования может обеспечить максимальный полезный эффект секвенирования SARS-CoV-2 и новых / вновь появляющихся патогенов в решении задач общественного здравоохранения. В настоящее время референс-лаборатории ВОЗ, которые выполняют подтверждающие тесты на COVID-19, удовлетворяют некоторые из имеющихся потребностей в секвенировании и анализе получаемых данных (40). В некоторых регионах уже имеются или находятся в процессе развития функциональные мощности для проведения секвенирования, которые смогут присоединиться к глобальной сети соответствующих лабораторий / рабочих групп. Чтобы определить вклад, который могут вносить лаборатории в составе сети, необходимо провести глобальную оценку потенциала для каждого элемента, показанного на рисунке 1. Различные лабораторные сети, специализирующиеся на изучении конкретных патогенов (например, работающие над проблемами устойчивости к противомикробным препаратам, исследующие возбудителей БВРС-КоВ, гриппа, кори, краснухи, полиомиелита и туберкулеза) в рамках своей деятельности по эпиднадзору вкладывают ресурсы в наращивание потенциала для секвенирования (8, 9, 41–43). Затраты на секвенирование все еще значительны, при этом многие компоненты рабочего процесса секвенирования могут быть использованы применительно к различным патогенам или к решению различных задач. Поэтому для обеспечения оптимального использования существующего потенциала рекомендуется развивать сотрудничество на уровне стран. Программы наращивания кадрового потенциала должны быть основаны на поэтапном подходе к формированию компетенций. Приоритеты в данной области зависят от конкретного контекста. Для некоторых стран имеет смысл создание потенциала для собственно лабораторных исследований, в то время как в других условиях более рационально выполнять лабораторное секвенирование в рамках аутсорсинга и сосредоточить внимание на вопросах биоинформатики, а также обработки и интерпретации данных. Эффективное сотрудничество, обмен информации, стандартизированные протоколы секвенирования, проведение совместных совещаний и учебных мероприятий, аудиты, контроль качества секвенирования и анализа, а также разработка эталонных стандартов для оценки различных процедур будут способствовать дальнейшей разработке высококачественных программ секвенирования SARS-CoV-2, равно

как и методов выявления и контроля других появляющихся патогенов. Там, где образцы совместно используются в масштабах всей сети, также должны быть созданы соответствующие механизмы для транспортировки образцов с соблюдением необходимых требований.

3. Практические соображения по реализации программы секвенирования генома вируса

Ниже приведен лишь общий обзор основных технических требований к созданию программы секвенирования. Для получения более подробной информации о секвенировании SARS-CoV-2 обратитесь к полному руководству по осуществлению секвенирования SARS-CoV-2 (17).

3.1 Практические соображения по разработке программы секвенирования SARS-CoV-2

Структура рабочего алгоритма секвенирования определяется поставленными задачами (таблица 1). В приложении I перечислены ключевые вопросы, на которые необходимо ответить до начала осуществления программы секвенирования SARS-CoV-2. В приложении II содержится контрольный перечень мероприятий, касающихся планирования такой программы. Рабочий алгоритм полногеномного секвенирования SARS-CoV-2 схематично показан на рисунке 2. Все работники, участвующие в программе секвенирования, должны пройти соответствующую учебную подготовку и инструктаж по выполнению возложенных на них функций. Следует определить круг заинтересованных сторон и обеспечить их консультативную поддержку и участие в процессе начиная с ранних стадий разработки программы. К таким заинтересованным сторонам относятся органы общественного здравоохранения, диагностические лаборатории, центры секвенирования, аналитические группы и, в зависимости от условий, службы профилактики инфекций и инфекционного контроля или службы гигиены труда, группы защиты прав пациентов, а также структуры, занимающиеся исследованиями вопросов передачи инфекции между человеком и животными. Чтобы обеспечить максимально эффективное использование данных секвенирования необходимо разработать и постоянно поддерживать каналы коммуникации, соответствующие задачам программы. Ключевое значение для извлечения полезных уроков и внедрения улучшений имеет проведение периодической оценки хода реализации проекта, а также его заключительной оценки. Успешное решение задач программы секвенирования, ориентированной на новые патогены, требует привлечения экспертов в следующих областях: (i) лабораторное секвенирование и безопасное обращение с образцами вирусов; (ii) составление точных геномов на основе исходных данных; (iii) анализ геномов для получения значимых результатов, полезных для обоснования мер реагирования на вспышку; (iv) свойства различных патогенных микроорганизмов. Большинство экспертов будут одновременно обладать необходимой квалификацией только в одной или двух из этих областей. Для быстрого получения результатов в областях (ii) и (iii) требуются мощные компьютерные ресурсы. Поэтому сотрудничество между экспертами с различными наборами навыков и объединение ресурсов часто является ключом к получению своевременных, точных и эффективных результатов, которые могут принести реальную пользу для дела общественного здравоохранения.



Рисунок 2. Рабочий алгоритм полногеномного секвенирования SARS-CoV-2. Следует учесть, что успешная реализация алгоритма предусматривает двустороннюю коммуникацию между экспертами, участвующими на разных этапах; например, те, кто обеспечивает интерпретацию данных, в идеале непосредственно согласовывают отбор секвенированных образцов с теми, кто участвует в их подготовке на более ранних этапах.

3.2 Этические аспекты

При планировании программы секвенирования важно учитывать этические факторы. Следует определить возможные риски социального ущерба для участников исследования и определить стратегии их снижения. Любые предлагаемые исследования должны быть оценены и одобрены комитетом по этике, который анализирует такие факторы, как социальная ценность, научная обоснованность, отбор участников, соотношение риска и выгоды, а также соблюдение принципов информированного согласия и уважительного отношения к участникам (44–46). Если исследователи не имеют достаточного опыта в выявлении возможных этических проблем, связанных с секвенированием эпидемических патогенов, таких как SARS-CoV-2, настоятельно рекомендуется использовать механизмы международного сотрудничества и привлекать соответствующих специалистов (44). Следует всемерно развивать равноправное и взаимовыгодное сотрудничество в области научных исследований в масштабе всего мира. При этом необходимо поддерживать ведущую и активную роль местных ученых на протяжении всего исследовательского процесса, поскольку они лучше понимают свои научные и медицинские системы и смогут более эффективно воплотить результаты в реальную практику (44, 45). Этические соображения, касающиеся обмена геномными последовательностями и метаданными, обсуждаются в разделе 3.7.

3.3 Соображения, касающиеся отбора и подготовки образцов

После формулирования задач необходимо в сотрудничестве с заинтересованными сторонами разработать стратегию отбора образцов. Подробную информацию по этому вопросу можно найти в руководстве по осуществлению секвенирования SARS-CoV-2 (17). В идеале критерии отбора образцов для секвенирования должны быть зафиксированы в метаданных, поскольку включение нерандомизированных подмножеств образцов может повлиять на надежность определенных генетических анализов, в частности филогенетического и филодинамического. Практические рекомендации по сбору клинических образцов содержатся в руководстве по диагностическому тестированию на SARS-CoV-2 (47). Перед секвенированием рекомендуется обогатить образец, так чтобы в нем преобладал генетический материал SARS-CoV-2. На этом этапе старайтесь избежать контаминации образца (17, 48, 49). Недорогим, быстрым и удобным способом увеличения количества вирусного генетического материала в образце до секвенирования являются подходы, основанные на ПЦР, например разработанный сетью ARTIC (51–53). Более подробная техническая информация и описание подходов к выбору оптимального метода для различных условий приведены в руководстве по осуществлению секвенирования SARS-CoV-2 (17). После первоначальной подготовки образцов для обогащения генетического материала можно готовить геномные библиотеки с использованием стандартных протоколов секвенирования, подходящих для любого вируса.

3.4 Лабораторные аспекты

Стратегии секвенирования SARS-CoV-2 включают целевые подходы, основанные на знании генома, и метагеномные подходы, не требующие предварительного знания геномной последовательности (54, 55). В приложении III кратко изложены основные преимущества и ограничения каждой из широко используемых технологий секвенирования. Прежде чем инвестировать ресурсы в наращивание потенциала секвенирования, следует проанализировать имеющиеся потребности для осуществления различных процессов по таким аспектам, как людские ресурсы, компетенции персонала, лабораторная инфраструктура, время выполнения операций, финансовые затраты, простота использования, последующая обработка данных, пропускная способность лабораторий и точность секвенирования. Число образцов для проведения анализа будет зависеть от задачи секвенирования. При расчете затрат учитывайте не только закупку оборудования для секвенирования, но и текущие расходы на реагенты, техническое обслуживание и сервисные контракты. Вопросы стоимости программы в настоящем руководстве не освещены, однако имеется недавно опубликованный обширный обзор этой темы (8). Для обеспечения надежного секвенирования должна быть создана базовая инфраструктура, включая бесперебойное подключение к интернету и электроснабжение, соответствующие средовые условия (например, для некоторых платформ требуется полное отсутствие вибрации и пыли, а также регулируемые показатели температуры и влажности воздуха) и система учета и хранения образцов. Следует соблюдать необходимые меры обеспечения биобезопасности и биозащищенности. Оценка затрат и основных требований к инфраструктуре может помочь решить, следует ли проводить фактическое секвенирование собственными силами или лучше передать его на аутсорсинг. Технология быстро меняется: некоторые методы устаревают, производители переходят на использование других приборов и/или реагентов. Прежде чем делать крупные закупки, рекомендуется установить, как долго производитель будет гарантированно поставлять реагенты и обеспечивать техническое обслуживание и

устранение неполадок в работе приобретаемого оборудования. При планировании программы следует также предусмотреть наличие вспомогательных реагентов и дополнительного оборудования для поддержки работы по секвенированию (например, инструменты и расходные материалы для экстракции [автоматизированной или ручной], для измерения количества генетического материала, для амплификации и инкубации, для очистки образцов, а также для хранения образцов и реагентов). Лаборатории, проводящие геномное секвенирование, должны располагать возможностями для высококачественного проведения ПЦР-тестов на SARS-CoV-2, подтвержденными внутренним и внешним контролем качества. Кроме того, должны устанавливаться и контролироваться показатели качества для каждого этапа процесса.

3.5 Биоинформатика и компьютерное обеспечение

Требования к оборудованию различаются в зависимости от используемого подхода (подробнее – см. руководство по осуществлению программы (17)). Объем полученных исходных данных зависит от метода секвенирования (см. приложение III) и количества секвенированных образцов (56). Вычислительные мощности, необходимые для анализа данных, также различаются в зависимости от задачи и метода секвенирования. Например, филогенетический анализ и выравнивание генома могут потребовать высокопроизводительных компьютерных мощностей, особенно там, где наборы данных велики. При разработке рабочего алгоритма секвенирования следует учитывать затраты на вычислительную архитектуру, необходимую для хранения и обработки данных. Биоинформационный алгоритм будет зависеть от лабораторных этапов до секвенирования, платформы секвенирования и используемых реагентов. Подробное описание биоинформационных алгоритмов приведено в руководстве по осуществлению программы (17).

3.6 Рекомендации по присвоению названий и составлению номенклатуры вирусов

Унифицированная номенклатура для SARS-CoV-2 еще не создана. В ее отсутствие обычно используются три основные номенклатурные стратегии. На основе вирусов, имеющих общего филогенетически установленного предка, определяют линии или клады (ветви). Базы данных GISAID и Nextstrain призваны обеспечить широкую классификацию глобально циркулирующих вирусов, присваивая названия различным филогенетическим кладам. Rambaut et al. предложили динамическую номенклатуру линий SARS-CoV-2, в которой отражены активно циркулирующие вирусные линии и те, которые распространяются в новые локации (57). Имеется программное обеспечение для автоматического отнесения новых последовательностей к соответствующим линиям и/или кладам (58–60). С ростом разнообразия геномов SARS-CoV-2 повышается потребность в единой номенклатуре (57, 61, 62). В ее отсутствие наилучший подход – перечислить конкретные линии и/или клады, используя все три обычно используемые системы, или, как минимум, четко указать, какая номенклатура используется.

3.7 Обмен геномными последовательностями и метаданными

Оперативный обмен данными о геномных последовательностях вирусов вместе с соответствующими анонимизированными эпидемиологическими и клиническими метаданными обеспечит получение максимального полезного эффекта геномного секвенирования применительно к мерам реагирования в области общественного здравоохранения (63–65). Широкий обмен последовательностями SARS-CoV-2, а также диагностическими протоколами, алгоритмами секвенирования и образцами во многом способствует наращиванию потенциала молекулярной диагностики в мировом масштабе (66–68). Научное/медицинское сообщество должно опираться на глобальное сотрудничество и своевременный обмен данными как во время текущей пандемии, так при будущих вспышках. Существует два различных варианта обмена данными о геномных последовательностях SARS-CoV-2: режим «общего пользования» (public-domain) и режим «открытого доступа» (public-access) (69). Базы данных общего пользования обеспечивают доступ к данным, не требуя идентификации получателей. К таким источникам относится, например, инициатива INSDC, функционирующая под управлением DDBJ, EMBL-EBI и NCBI. В базах данных открытого доступа, таких как GISAID, пользователи должны идентифицировать себя; это делается с целью обеспечить прозрачное использование данных, эффективный надзор и защиту прав поставщиков данных, приложить максимальные усилия для сотрудничества с поставщиками данных и признать их вклад в публикуемые результаты. Использование вышеупомянутых баз данных бесплатно и доступно для всех. При разработке проектов секвенирования крайне важно определить, какой из этих источников является наиболее подходящим и необходимы ли другие методы доступа и совместного использования ДГП (44). Одним из важнейших факторов обеспечения постоянного обмена генетическими данными является должное признание тех, кто собирает клинические образцы и генерирует геномные последовательности вирусов. При использовании

общедоступных данных следует всегда указывать их источники, а также давать ссылки на соответствующие публикации, равно как и на материалы, готовящиеся к печати.

Возможен полезный обмен данными в различных форматах о последовательностях, включая полностью и частично консенсусные последовательности, а также необработанные данные. Перед обменом необходимо тщательно оценивать качество данных о последовательности, включая потенциальное загрязнение ампликонами, полученными в процессе ПЦР-исследования. При обнаружении и после исправления ошибки лаборатории должны связаться с платформами обмена последовательностями для обновления ранее представленных частичных последовательностей. Имеет существенное значение совместное использование необработанных данных секвенирования вируса (то есть всех отдельных секвенированных фрагментов вирусного генома до их сборки в единый консенсусный геном), поскольку оно позволяет напрямую сравнивать эффект различных биоинформационных подходов для генерации консенсусного генома и облегчает исправление ошибок. Учитывая большой размер данных секвенированных библиотек, совместное использование данных на уровне считывания может быть сопряжено с трудностями в условиях ограниченной скорости загрузки или нестабильного соединения с интернетом. При любом обмене данными необходимо защищать анонимность пациента. Для этого перед осуществлением обмена необработанные данные, содержащие компоненты человеческого генома, должны быть отфильтрованы с сохранением только вирусных ДГП (43). Для того, чтобы данные о последовательностях могли использоваться во многих филогенетических исследованиях необходимо предоставлять метаданные, такие как дата и ориентировочная локация взятия образца. Однако следует тщательно рассмотреть вопрос о том, какие именно метаданные можно распространять без ущерба для анонимности пациента.

Результаты предварительного анализа ДГП часто публикуются на форумах, различных платформах и серверах препринтов (70–72). В своих публикациях, как и в любых научных отчетах, ученые должны учитывать сильные и слабые стороны проведенного ими анализа и то, как эти данные могут быть интерпретированы или представлены различными аудиториями до рецензирования. Ученым рекомендуется давать четкую интерпретацию своих выводов, чтобы свести к минимуму недопонимание или неправильное использование результатов.

4. Задачи геномного секвенирования SARS-CoV-2 для нужд общественного здравоохранения

Ниже кратко описаны примеры ключевых задач секвенирования SARS-CoV-2 для нужд общественного здравоохранения; более подробные сведения изложены в руководстве по осуществлению секвенирования SARS-CoV-2 (17).

4.1 Идентификация и характеристика SARS-CoV-2 и разработка контрмер

Широкая публикация полной генетической последовательности нового вируса в начале января 2020 г. имела важнейшее значение для характеристики SARS-CoV-2, что позволило быстро создать диагностические тесты и способствовало разработке методов лечения и вакцин (73–80). Геномное секвенирование позволяет сформировать более глубокие представления о происхождении и передаче новых вирусов. Изучив исходные геномы SARS-CoV-2, полученные в Ухане (Китайская Народная Республика) и прилегающих районах, удалось установить, что этот вирус проник в человеческую популяцию, самое позднее, в ноябре–декабре 2019 г. (74, 75, 81, 82). Исследование образцов, взятых от разнообразных животных, может вносить вклад в идентификацию исходного животного источника и/или потенциальных промежуточных хозяев (81, 83, 84).

4.2 Мониторинг передачи и географического распространения

Филогенетика – это научное направление, посвященное исследованию эволюционных связей между различными организмами путем анализа их геномных последовательностей. Этот подход используется почти во всех областях биологии и дает научное обоснование для принятия различных мер в области общественного здравоохранения (17, 85–87). Наличие эпидемиологических или клинических данных, относящихся к взятию образцов для определения геномной последовательности вируса (эти сведения обозначают как метаданные – например, дата отбора проб, местонахождение пациента, клинические параметры), способствует более надежной интерпретации результатов филогенетического анализа. Набор требуемых метаданных зависит от задачи геномного секвенирования. Технические аспекты филогенетического и филодинамического анализа, метаданные и общие риски неверной интерпретации описаны в руководстве по осуществлению секвенирования SARS-CoV-2 (17).

4.2.1 Исследование географического распространения и реинтродукции между популяциями

Для отслеживания циркуляции SARS-CoV-2 в масштабах всего мира применяется филогеографический анализ, использующий геномные последовательности вирусов в сопоставлении с информацией о месте взятия образцов (13, 47, 88–90). Филогеографические реконструкции часто требуют привлечения значительных компьютерных ресурсов, для сокращения которых используют метод вторичной выборки. Выводы о перемещении вируса или о стране происхождения конкретных клад/линий могут представлять ценность, но их следует делать с осторожностью, поскольку на филогеографическую реконструкцию может влиять одновременно целый ряд факторов. Например, отсутствие доступных геномов SARS-CoV-2 из определенных территорий может снижать вероятность того, что эти территории будут идентифицированы как географический источник той или иной линии/клады. В некоторых базах данных геномные последовательности относят не к месту предполагаемого инфицирования пациента, а к месту взятия образца. В тех случаях, когда эти локации различаются, например, если пациент находился в поездке в период между инфицированием и взятием образца, филогеографический анализ может привести к неточной реконструкции происхождения конкретных клад/линий (91). Таким образом, результаты следует интерпретировать с осторожностью, не исходя из заведомого предположения, что филогеографические результаты всегда отражают истинные закономерности пространственно-временного распространения вируса.

Для исследования факторов, обусловивших распространение вируса, применяются также методы мониторинга географического распространения эпидемической вспышки и ее эволюции во времени (92). Выявление движущих сил передачи может помочь сформировать новые стратегии предотвращения распространения инфекции. Этот подход использовался, например, в Западной Африке при вспышках болезни, вызванной вирусом Эбола (93, 94). Что касается SARS-CoV-2, то в ряде стран использовалось геномное секвенирование для установления роли местной передачи в сравнении с завозными случаями, и на основе этой информации принимались соответствующие директивные решения (89, 90, 95–100). Филодинамическая идентификация факторов, важных для понимания передачи, часто требует затрат компьютерных ресурсов и сбора обширных данных о потенциальных значимых факторах (например, таких как плотность и мобильность населения). Поэтому конечные результаты анализа нередко удается получить лишь через недели и месяцы после секвенирования генома вируса. Однако даже ретроспективный анализ полезен для обоснования вмешательств в отношении SARS-CoV-2 или потенциальных новых патогенов.

4.2.2 Оценка фактических данных о путях/кластерах передачи

Филогенетическая кластеризация была использована в рамках исследований кластеров и вспышек SARS-CoV-2. Анализ кластеров передачи может служить руководством для принятия местных решений о том, необходимы ли меры контроля для предотвращения передачи инфекции в условиях реальной вспышки (101). Учитывая относительно медленную скорость эволюции SARS-CoV-2 (одна нуклеотидная замена каждые две недели), ожидается, что многие индивидуальные события передачи не удастся проследить на основе геномных данных (35). Филогенетическая однородность (кластеризация) последовательностей от пациентов с одним и тем же гипотетическим источником инфицирования будет демонстрировать соответствие этому источнику (хотя и не сможет служить точным доказательством объективной связи). Напротив, филогенетическое разделение вирусных последовательностей от пациентов с одним и тем же предполагаемым источником инфицирования убедительно указывает на то, что общий источник инфекции идентифицирован неверно.

4.2.3 Количественная оценка периодов передачи и отслеживание динамики коэффициента распространения

Филогенетические подходы по принципу молекулярных часов могут помочь оценить верхний и нижний пределы времени циркуляции генетических линий исследованного вируса в данной популяции (74, 90, 102–106). Эта методика может обеспечить более точную информацию о периоде передачи вируса, чем клиническая идентификация случаев, особенно на ранних или поздних стадиях вспышки, когда эпиднадзор ограничен. Изучение вариаций в обнаруженных геномных последовательностях позволяет выявить клинически не обнаруженную локальную передачу. При подозрении на наличие подобной скрытой циркуляции необходимо проводить более тщательный диагностический эпиднадзор.

Анализ геномных последовательностей позволяет также рассчитать число лиц, которые заражаются от одного инфицированного человека в данной популяции (коэффициент распространения, или

репродуктивное число вируса [R_0]), и оценить относительные изменения размера вспышки с течением времени. Эта информация также может быть использована для оценки эффекта конкретных мер контроля.

4.2.4 Мониторинг сточных вод и осадков

Мониторинг сточных вод является важным инструментом для отслеживания скрытой циркуляции патогенных микроорганизмов, таких как полиовирус, в окружающей среде. Этот подход дает возможность выявлять циркуляцию (еще до обнаружения клинически выраженных случаев инфекции), оценить распространенность, понять генетические связи и оценить генетическое разнообразие (107, 108). В ряде стран удалось с помощью молекулярных методов выявить ПНК SARS-CoV-2 в сточных водах (109–115). Таким образом, экологический надзор является перспективным подходом, особенно в условиях низкой распространенности, для выявления скрытых носителей и служит системой «раннего предупреждения» об интродукции SARS-CoV-2 и об изменениях показателей циркуляции вируса (109, 116, 117).

4.2.5 Расследование потенциальных реинфекций

Сезонные коронавирусы могут повторно инфицировать человека (118). Для SARS-CoV-2 также были задокументированы случаи реинфекции (119–124). В этом контексте можно сравнить геномные последовательности SARS-CoV-2 из образцов, взятых во время первого и последующих эпизодов, чтобы определить, является ли новое обнаружение SARS-CoV-2 результатом реинфекции или следствием затяжного периода первичного выделения вируса (125, 126). Если последовательности из каждого эпизода имеют резкие генетические различия, например соответствуют разным, достоверно известным линиям/кладам, последующие эпизоды можно считать реинфекциями. Для того чтобы понять, связана ли реинфекция с антигенно отличным штаммом или с отсутствием защитного иммунного ответа от первоначальной инфекции, необходимо параллельное проведение серологических исследований. Таким образом, секвенирование позволяет более точно определить частоту и потенциальные факторы риска реинфекции (125, 126).

4.3 Мониторинг эволюции SARS-CoV-2

4.3.1 Структурированная оценка потенциально значимых мутаций

Геномное секвенирование можно использовать для выявления генетических замен, которые могут изменять фенотипические характеристики вируса, такие как трансмиссивность и вирулентность. В процессе циркуляции все вирусы претерпевают генетические изменения, однако эти изменения, как правило, не оказывают существенного влияния на поведение вируса. Тем не менее в редких случаях генетические изменения SARS-CoV-2 могут вызывать фенотипические сдвиги, имеющие важное значение для общественного здравоохранения. Выявление и характеристика таких изменений является сложной задачей. В целом трудно с уверенностью установить, обусловлено ли подобными фенотипическими сдвигами увеличение относительной распространенности той или иной мутации с течением времени. Например, преобладание в популяции определенной вирусной клады/линии может быть обусловлено скорее поведенческими характеристиками инфицированного населения, чем поведением самого вируса. В большинстве случаев наблюдаемый процесс носит стохастический характер. Однако, если филогенетический анализ дает основание предполагать потенциальное эпидемиологическое или клиническое воздействие конкретных мутаций/вариантов, необходимо проведение надлежащих клинических геномных исследований для оценки потенциальных вариантов, которые могли бы обуславливать клинически наблюдаемые фенотипические изменения. Генетические изменения, которые предположительно являются источником фенотипических сдвигов, следует оценивать с использованием стандартизированных подходов, включая исследования по моделированию белков для определения потенциального воздействия и эксперименты *in vitro* или *in vivo* с соответствующим мутантным вирусом (клонами) для подтверждения или исключения специфических свойств вариантов-кандидатов. На основе сети референтных лабораторий ВОЗ по SARS-CoV-2 создана специальная рабочая группа ВОЗ по проблемам эволюции SARS-CoV-2 (SEWG). Эта группа призвана оперативно предоставлять ВОЗ сведения по идентификации и оценке потенциально значимых мутаций, а также рекомендации по снижению риска (16, 40, 127).

4.3.2 Мониторинг влияния эволюции SARS-CoV-2 на принимаемые контрмеры

Глобальный мониторинг геномов SARS-CoV-2 должен в идеале фиксировать появление линий SARS-CoV-2 с генетическими вариантами, влияющими на эффективность контрмер. Развертывание кампаний вакцинации против SARS-CoV-2 должно сопровождаться отслеживанием геномных изменений этого вируса, которые могут снижать эффективность вакцины. Мониторинг и расследование возможных причин неэффективности вакцины должны включать геномный анализ для выявления потенциальных «ускользающих мутантов» (мутантных разновидностей вируса, не восприимчивых к вакцине). Кроме того, секвенирование может помочь в идентификации таких мутантов, «ускользающих» от воздействия моноклональных антител (128), а также в разработке адекватных средств лечения. Геномный мониторинг для выявления лекарственной устойчивости использовался и для других патогенов, включая вирусы гриппа, ВИЧ и микобактерии туберкулеза (9, 129).

Геномное секвенирование также может быть использовано для мониторинга вирусных генетических изменений, влияющих на эффективность молекулярных диагностических тестов. Методы использования множественных мишеней для обнаружения SARS-CoV-2, такие как мультиплексная ПЦР, нацеленная на две или более областей генома вируса, является экономически эффективным подходом для снижения частоты обусловленных эволюцией вируса ложноотрицательных результатов тестов (47, 127). Секвенирование вирусного генома или гена-мишени может быть предпринято в тех случаях, когда при повторных исследованиях не удается обнаружить одну мишень или когда появляются различия в чувствительности анализов, нацеленных на различные области генома, с целью выявления возможной причины этих отклонений. Дополнительная информация приведена в руководстве по диагностическому тестированию на вирус SARS-CoV-2 (47). Вирусные мутации также могут влиять на результаты антигенного или серологического анализа, и в таких ситуациях геномное секвенирование может помочь обнаружить на ранней стадии потенциальную несостоятельность тестов (130–132).

4.3.3 Эволюция SARS-CoV-2 применительно к передаче вируса между человеком и животными

Когда вирус передается от одного биологического вида к другому, он может адаптироваться к своему новому хозяину. Рецептор АПФ-2, на который нацелен SARS-CoV-2, аналогичен у людей и многих видов животных (в основном млекопитающих) (133, 134). Это обуславливает наличие потенциала для передачи инфекции от человека животному (антропоноз). Однако наряду с гомологичными свойствами вышеуказанного рецептора АПФ-2, что предполагает восприимчивость животных к SARS-CoV-2, имеются и другие белки, критичные для репликации вируса, которые могут отличаться и служить барьером для инфицирования животных конкретных видов. Поэтому для оценки восприимчивости животных необходимы соответствующие данные о реальных или экспериментальных инфекциях. Были продемонстрированы восприимчивость различных видов животных к SARS-CoV-2 (15, 127, 135–151) и передача вируса в популяциях отдельных видов (например, среди норок и хомяков). Аналогичным образом выявлена устойчивость некоторых видов животных к инфицированию SARS-CoV-2. Если возникают изменения в геномной последовательности, кодирующей вирусный спайковый белок, который связывается с рецепторами АПФ-2, они могут способствовать переходу к новым видам хозяев. Спайковый белок SARS-CoV-2, особенно его рецептор-связывающий домен (RBD), является критической мишенью для естественного и вакцинного иммунитета (28–32). Диверсификация участков генома, кодирующих спайковый белок, уже наблюдалась в тех случаях, когда вирус SARS-CoV-2 передавался от людей норкам со вторичной зоонозной передачей обратно людям (149). Таким образом, диверсификация гена спайкового белка после передачи SARS-CoV-2 между человеком и животным, вероятно, увеличивает риск появления штаммов, которые могут легко реинфицировать человека и вызывать снижение эффективности вакцинации или терапии моноклональными антителами (33). В качестве профилактической меры странам рекомендуется проводить оценку риска потенциального распространения вируса на другие виды животных, обитающих рядом с людьми в домашней, сельскохозяйственной или иной среде (127, 152–154). Необходимо разработать стратегии снижения рисков и обеспечить адекватный мониторинг для своевременного выявления таких событий. Мониторинг требует ресурсов, поэтому по мере возможности стратегии должны носить направленный, целевой характер. Для решения этой задачи требуется внедрение стратегии «Одно здоровье для всех», объединяющей усилия различных дисциплин, включая общественное здравоохранение, клиническую медицину, гигиену труда, ветеринарию и охрану дикой природы, а также лесное хозяйство и управление природными ресурсами (127, 152, 155–157). Сотрудничество должно также быть сосредоточено на разработке совместных протоколов расследования вспышек, профилактики инфекций и инфекционного контроля, тестировании потенциально инфицированных людей и животных и обмене данными о последовательностях. При

возникновении случаев антропонозной или вторичной зоонозной инфекции секвенирование геномов вирусов может помочь оценить возможные новые риски, связанные с этими событиями.

Методы

Настоящие временные рекомендации составлены на основе документа "Genomic sequencing of SARS-CoV-2: a guide to implementation for maximum impact on public health" (Геномное секвенирование SARS-CoV-2: руководство по внедрению для обеспечения максимального позитивного воздействия на общественное здравоохранение). Это руководство было разработано в консультации с экспертами, обладающими опытом работы по различным аспектам геномного секвенирования и являющимися представителями Глобального лабораторного альянса по особо опасным патогенам (GLAD-HP) – референтной сети для подтверждающего тестирования на COVID-19, а также Глобальной сети по оповещению о вспышках болезней и ответным действиям (GOARN). После первоначальных обсуждений в группе технических составителей, возглавляемой временным советником, и среди членов Лабораторной группы ВОЗ по COVID-19 были запрошены материалы от других экспертов как внутри ВОЗ, так и за ее пределами, и проведены два онлайн-совещания для решения спорных вопросов. Впоследствии были подготовлены временные рекомендации для национальных заинтересованных сторон, содержащие краткое изложение соответствующей информации из руководства и дополнительные сведения для данной целевой аудитории. Временные рекомендации были затем направлены экспертам, участвовавшим в разработке руководства по осуществлению секвенирования, членам референтной сети подтверждающего тестирования на COVID-19, в региональные координационные центры по лабораторным исследованиям, а также другим заинтересованным сторонам для получения отзывов, замечаний и предложений. Все участники процесса перечислены в приведенном ниже списке составителей.

Планы обновления

ВОЗ продолжает проводить тщательный мониторинг ситуации в целях своевременного выявления любых изменений, которые могут оказывать влияние на данные временные рекомендации. В случае возникновения таких изменений ВОЗ выпустит следующую обновленную версию. В противном случае срок действия настоящего временного руководящего документа истекает через один год после даты его опубликования.

Составители

Руководящая группа ВОЗ: Селин Барнадас, Себастьян Конн, Роджер Эванс, Брюс Аллан Гордон, Варья Грабовец, Ребекка Грант, Фрэнсис Инбанатан, Фрэнк Кониингс, Карен Нахапетян, Марко Марклевиц, Мари-Джо Медина, Кейт Олив Медликотт, Мик Малдерс, Марк Д. Перкинс, Магди Самаан; Оливер Шмолль, Мария ван Керкхове; Карин фон Эйе; Джоанна Цветьенга.

Внешние составители: Ким Беншоп, Нидерландский национальный институт общественного здравоохранения и окружающей среды (RIVM), Билтховен, Нидерланды; Антонино Ди Каро, Национальный институт инфекционных болезней Лаццаро Спаланцани, Италия; Нуно Родригес Фария, Имперский колледж Лондона и Оксфордский университет, Оксфорд, Соединенное Королевство; Таня Голубчик, Оксфордский университет, Оксфорд, Великобритания; Кит Гамильтон, Всемирная организация охраны здоровья животных (МЭБ); Эдвард Холмс, Сиднейский университет, Австралия; Сара Си Хилл, Королевский ветеринарный колледж Лондона и Оксфордский университет, Соединенное Королевство; Эрик Карлссон, Пастеровский институт Камбоджи; Мэн Лин Мой, Университет Нагасаки, Япония; Лео Пун, Гонконгский университет, специальный административный район Гонконга (САР), Китай; Джеймс Шепард, Университет Глазго, Соединенное Королевство; Этьен Симон-Лорьер, Институт Пастера, Париж, Франция. Другие эксперты, внесшие вклад в подготовку руководства по внедрению секвенирования SARS-CoV-2, которое послужило основой для настоящего документа: Кристиан Андерсен, Исследовательский центр Скриппс, Ла-Хойя, Калифорния, США; Хулио Крода, Министерство здравоохранения, Рио-де-Жанейро, Бразилия; Тулио де Оливейра, Университет Квазулу-Натал, Дурбан, Южная Африка; Симон Делликур, Свободный университет Брюсселя, Бельгия; Натан Грубау, Йельский университет, Нью-Хейвен, Коннектикут, США; Лиана Кафетзопуло, Левенский католический университет, Бельгия; Марион Купманс, Медицинский центр Университета им. Эразмуса, Роттердам, Нидерланды; Томми Лам, Университет

Гонконг, САР Гонконг, Китай; Филипп Лемей, Левенский католический университет, Бельгия; Тзе Минн Мак, Национальный центр инфекционных болезней, Сингапур; Марсио Роберто Нуньес, Институт им. Эвандро Шагаса, Ананиндеуа, Пара, Бразилия; Бас Оуде Муннинк, Медицинский центр Университета им. Эразмуса, Роттердам, Нидерланды; Густаво Паласиос, Агентство США по международному развитию, Вашингтон, округ Колумбия, США; Стивен Паллан, Служба общественного здравоохранения Англии, Лондон, Соединенное Королевство; Тимоти Воган, Швейцарская высшая техническая школа в Цюрихе, Швейцария; Джош Квик, Бирмингемский университет, Соединенное Королевство; Эндрю Рамбо, Эдинбургский университет, Соединенное Королевство; Шанталь Ройскен, RIVM, Билтховен, Нидерланды; Танья Стадлер, Швейцарская высшая техническая школа в Цюрихе, Швейцария; Марк Сачард, Калифорнийский университет в Лос-Анджелесе, Калифорния, США; Хуаю Тянь, Пекинский университет по подготовке преподавателей, Китай; Лиа ван дер Хойк, Амстердамский медицинский центр, Нидерланды; Эрик Волц, Имперский колледж Лондона, Соединенное Королевство.

Декларации интересов

Все составители представили на рассмотрение заполненные формы декларации интересов. Эксперты, у которых был идентифицирован потенциальный конфликт интересов или предвзятое отношение к конкретным продуктам, были исключены из участия в консультативном процессе по выбору платформы для секвенирования.

Финансирование

Из фондов ВОЗ.

Библиография

- Fraser C, Donnelly CA, Cauchemez S, Hanage WP, Van Kerkhove MD, Hollingsworth TD, et al. Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings. *Science*. 2009;324:1557–61. doi: 10.1126/science.1176062.
- Rambaut A, Holmes E. The early molecular epidemiology of the swine-origin A/H1N1 human influenza pandemic. *PLoS Curr*. 2009;1:RRN1003. doi: 10.1371/currents.rrn1003.
- Smith GJD, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*. 2009;459:1122–5. doi: 10.1038/nature08182.
- Mena I, Nelson MI, Quezada-Monroy F, Dutta J, Cortes-Fernández R, Lara-Puente JH, et al. Origins of the 2009 H1N1 influenza pandemic in swine in Mexico. *eLife*. 2016;5:e16777. doi: 10.7554/eLife.16777.
- Ladner JT, Wiley MR, Mate S, Dudas G, Prieto K, Lovett S, et al. Evolution and spread of Ebola virus in Liberia, 2014–2015. *Cell Host Microbe*. 2015;18:659–69. doi: 10.1016/j.chom.2015.11.008.
- Stadler T, Kühnert D, Rasmussen DA, Plessis dL. Insights into the early epidemic spread of Ebola in Sierra Leone provided by viral sequence data. *PLoS Curr*. 2014;6. doi: 10.1371/currents.outbreaks.02bc6d927ecee7bbd33532ec8ba6a25f.
- Smits SL, Pas SD, Reusken CB, Haagmans BL, Pertile P, Cancedda C, et al. Genotypic anomaly in Ebola virus strains circulating in Magazine Wharf area, Freetown, Sierra Leone, 2015. *Euro Surveill*. 2015;20. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2015.20.40.30035.
- GLASS whole-genome sequencing for surveillance of antimicrobial resistance. Geneva: World Health Organization; 2020 (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/334354>, по состоянию на 20 ноября 2020 г.).
- The use of next-generation sequencing technologies for the detection of mutations associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex: technical guidance. Geneva: World Health Organization; 2018 (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/274443>, по состоянию на 15 ноября 2020 г.).
- Whole genome sequencing for foodborne disease surveillance: landscape paper. Geneva: World Health Organization; 2018 (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/272430>, по состоянию на 25 ноября 2020 г.).
- Next-generation sequencing of influenza viruses: general information for national influenza centres. Geneva: World Health Organization; 2020 (https://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/national_influenza_centres/NGS_guidance_for_NICs.pdf?ua=1, по состоянию на 20 ноября 2020 г.).
- GISAID (<https://www.gisaid.org/>, по состоянию на 5 января 2021 г.).
- Genomic epidemiology of novel coronavirus: global subsampling [website]. Nextstrain; 2020 (<https://nextstrain.org/ncov/global>, по состоянию на 4 декабря 2020 г.).
- Volz E, Bagnuelin M, Bhatia S, Boonyasiri A, Cori A, Cucunuba Z, et al. Report 5 - phylogenetic analysis of SARS-CoV-2. London: Imperial College London; 2020 (<http://www.imperial.ac.uk/medicine/departments/school-public-health/infectious-disease-epidemiology/mrc-global-infectious-disease-analysis/covid-19/report-5-phylogenetics-of-sars-cov-2/>, по состоянию на 26 июня 2020 г.).
- Oude Munnink BB, Sikkema RS, Nieuwenhuijse DF, Molenaar RJ, Munger E, Molenkamp R, et al. Transmission of SARS-CoV-2 on mink farms between humans and mink and back to humans. *Science*. 2020. doi: 10.1126/science.abe5901.
- Coronavirus disease (COVID-19): situation report – 185. Geneva: World Health Organization; 2020 (https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200723-covid-19-sitrep-185.pdf?sfvrsn=9395b7bf_2, по состоянию на 15 ноября 2020 г.).

17. Genomic sequencing of SARS-CoV-2: a guide to implementation for maximum impact on public health. Geneva: World Health Organization; 2020. (<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/338480/9789240018440-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>, по состоянию на 8 января 2021 г.)
18. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV); 2020 (<https://talk.ictvonline.org/>, по состоянию на 27 июля 2020 г.).
19. Gorbalenya ABS, Baric R, de Groot R, Drosten C, Gulyaeva A, Haagmans B, et al. The species *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus*: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020;5:536–44. doi: 10.1038/s41564-020-0695-z.
20. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020;382:727–33. doi: 10.1056/NEJMoa2001017.
21. Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, Fatima U, Singh IK, Singh A, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: structural genomics approach. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020;1866:165878. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165878.
22. Yoshimoto FK. The proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2 or n-CoV19), the cause of COVID-19. *Protein J.* 2020;39:198–216. doi: 10.1007/s10930-020-09901-4.
23. Kim D, Lee JY, Yang JS, Kim JW, Kim VN, Chang H. The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome. *Cell.* 2020;181:914–21 e10. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.011.
24. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet.* 2020;395:565–74. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
25. Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science.* 2020;367:1444–8. doi: 10.1126/science.abb2762.
26. Ni W, Yang X, Yang D, Bao J, Li R, Xiao Y, et al. Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in COVID-19. *Crit Care.* 2020;24:422. doi: 10.1186/s13054-020-03120-0.
27. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Kruger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell.* 2020;181:271–80 e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
28. Amanat F, Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines: status report. *Immunity.* 2020;52:583–9. doi: 10.1016/j.immuni.2020.03.007.
29. Brouwer PJM, Caniels TG, van der Straten K, Snitselaar JL, Aldon Y, Bangaru S, et al. Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science.* 2020;369:643–50. doi: 10.1126/science.abc5902.
30. Tai W, He L, Zhang X, Pu J, Voronin D, Jiang S, et al. Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cell Mol Immunol.* 2020;17:613–20. doi: 10.1038/s41423-020-0400-4.
31. Shi R, Shan C, Duan X, Chen Z, Liu P, Song J, et al. A human neutralizing antibody targets the receptor-binding site of SARS-CoV-2. *Nature.* 2020;584:120–4. doi: 10.1038/s41586-020-2381-y.
32. Rogers TF, Zhao F, Huang D, Beutler N, Burns A, He WT, et al. Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model. *Science.* 2020;369:956–63. doi: 10.1126/science.abc7520.
33. Li Q, Wu J, Nie J, Zhang L, Hao H, Liu S, et al. The impact of mutations in SARS-CoV-2 spike on viral infectivity and antigenicity. *Cell.* 2020;182:1284–94 e9. doi: 10.1016/j.cell.2020.07.012.
34. Candido DS, Claro IM, de Jesus JG, Souza WM, Moreira FRR, Dellicour S, et al. Evolution and epidemic spread of SARS-CoV-2 in Brazil. *Science.* 2020;369:1255–60. doi: 10.1126/science.abd2161.
35. van Dorp L, Acman M, Richard D, Shaw LP, Ford CE, Ormond L, et al. Emergence of genomic diversity and recurrent mutations in SARS-CoV-2. *Infect Genet Evol.* 2020;83:104351. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104351.
36. Xu W, Zhang Y, Wang H, Zhu Z, Mao N, Mulders MN, et al. Global and national laboratory networks support high quality surveillance for measles and rubella. *Int Health.* 2017;9:184–9. doi: 10.1093/inthealth/ihx017.
37. Mulders MN, Serhan F, Goodson JL, Icenogle J, Johnson BW, Rota PA. Expansion of surveillance for vaccine-preventable diseases: building on the global polio laboratory network and the global measles and rubella laboratory network platforms. *J Infect Dis.* 2017;216:S324–S30. doi: 10.1093/infdis/jix077.
38. Diop OM, Kew OM, de Gourville EM, Pallansch MA. The global polio laboratory network as a platform for the viral vaccine-preventable and emerging diseases laboratory networks. *J Infect Dis.* 2017;216:S299–S307. doi: 10.1093/infdis/jix092.
39. Hay AJ, McCauley JW. The WHO Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS): a future perspective. *Influenza Other Respir Viruses.* 2018;12:551–7. doi: 10.1111/irv.12565.
40. Terms of reference for WHO reference laboratories providing confirmatory testing for COVID-19. Geneva: World Health Organization; 2020 (<https://www.who.int/publications/m/item/terms-of-reference-for-who-reference-laboratories-providing-confirmatory-testing-for-covid-19>, по состоянию на 26 июня 2020 г.).
41. RubenS database for rubella sequences (<http://www.who-rubella.org/>, по состоянию на 26 июня 2020 г.).
42. MeaNS: Measles nucleotide surveillance (<http://www.who-measles.org>, по состоянию на 26 июня 2020 г.).
43. Roy S, LaFramboise WA, Nikiforov YE, Nikiforova MN, Routbort MJ, Pfeifer J, et al. Next-generation sequencing informatics: challenges and strategies for implementation in a clinical environment. *Arch Pathol Lab Med.* 2016;140:958–75. doi: 10.5858/arpa.2015-0507-RA.
44. Mutenherwa F, Wassenaar DR, de Oliveira T. Experts' perspectives on key ethical issues associated with HIV phylogenetics as applied in HIV transmission dynamics research. *J Empir Res Hum Res Ethics.* 2019;14:61–77. doi: 10.1177/1556264618809608.
45. Emanuel EJ, Wendler D, Grady C. What makes clinical research ethical? *JAMA.* 2000;283:2701–11. doi: 10.1001/jama.283.20.2701.
46. WHO guidelines on ethical issues in public health surveillance. Geneva: World Health Organization; 2017 (<https://www.who.int/ethics/publications/public-health-surveillance/en/>, по состоянию на 15 ноября 2020 г.).
47. Диагностическое тестирование для определения вируса SARS-CoV-2: временные рекомендации, 11 сентября 2020 г. Женева: Всемирная организация здравоохранения; 2020 (<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/334254/WHO-2019-nCoV-laboratory-2020.6-rus.pdf>, по состоянию на 11 января 2020 г.).
48. MacCannell D. SARS-CoV-2 sequencing (https://github.com/CDCgov/SARS-CoV-2_Sequencing, по состоянию на 1 ноября 2020 г.).
49. Cesare MD. Probe-based target enrichment of SARS-CoV-2 [Protocol]. University of Oxford; 2020. doi: 10.17504/protocols.io.bd5di826.

50. Vogels CBF, Brito AF, Wyllie AL, Fauver JR, Ott IM, Kalinich CC, et al. Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets. *Nat Microbiol.* 2020;5:1299–1305. doi: 10.1038/s41564-020-0761-6.
51. Quick J, Grubaugh ND, Pullan ST, Claro IM, Smith AD, Gangavarapu K, et al. Multiplex PCR method for minION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nat Protoc.* 2017;12:1261–76. doi: 10.1038/nprot.2017.066.
52. Grubaugh ND, Gangavarapu K, Quick J, Matteson NL, De Jesus JG, Main BJ, et al. An amplicon-based sequencing framework for accurately measuring intrahost virus diversity using PrimalSeq and iVar. *Genome Biol.* 2019;20:8. doi: 10.1186/s13059-018-1618-7.
53. Matteson N, Grubaugh N, Gangavarapu K, Quick J, Loman N, Andersen K. PrimalSeq: Generation of tiled virus amplicons for MiSeq sequencing [Protocol]. 2020. doi: 10.17504/protocols.io.bez7jf9n.
54. Quince C, Walker AW, Simpson JT, Loman NJ, Segata N. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nat Biotechnol.* 2017;35:833–44. doi: 10.1038/nbt.3935.
55. Bragg L, Tyson GW. Metagenomics using next-generation sequencing. *Methods Mol Biol.* 2014;1096:183–201. doi: 10.1007/978-1-62703-712-9_15.
56. Xiao M, Liu X, Ji J, Li M, Li J, Yang L, et al. Multiple approaches for massively parallel sequencing of SARS-CoV-2 genomes directly from clinical samples. *Genome Med.* 2020;12:57. doi: 10.1186/s13073-020-00751-4.
57. Rambaut A, Holmes EC, O’Toole Á, Hill V, McCrone JT, Ruis C, et al. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nat Microbiol.* 2020;5:1403–7. doi: 10.1038/s41564-020-0770-5.
58. Singer J, Gifford R, Cotten M, Robertson D. CoV-GLUE: A web application for tracking SARS-CoV-2 genomic variation. Preprints. 2020:2020060225. doi: 10.20944/preprints202006.0225.v1.
59. CoVsurver: mutation analysis of hCoV-19. GISAID (<https://www.gisaid.org/epiflu-applications/covsurver-mutations-app/>, по состоянию на 11 декабря 2020 г.).
60. Pangolin COVID-19 lineage assigner (<https://pangolin.cog-uk.io/>, по состоянию на 11 декабря 2020 г.).
61. Fauquet CM, Fargette D. International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. *Viol J.* 2005;2:64. doi: 10.1186/1743-422X-2-64.
62. Alm E, Broberg EK, Connor T, Hodcroft EB, Komissarov AB, Maurer-Stroh S, et al. Geographical and temporal distribution of SARS-CoV-2 clades in the WHO European Region, January to June 2020. *Euro Surveill.* 2020;25. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.32.2001410.
63. Policy statement on data sharing by WHO in the context of public health emergencies (as of 13 April 2016). Geneva: World Health Organization Geneva; 2016 (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/254440>, по состоянию на 25 ноября 2020 г.).
64. Механизм обеспечения готовности к пандемическому гриппу для обмена вирусами гриппа и доступа к вакцинам и другим преимуществам. Женева: Всемирная организация здравоохранения; 2011 г. (https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44796/9789244503089_rus.pdf, по состоянию на 11 января 2021 г.).
65. Исполнительный комитет, 140-я сессия, пункт 7.5 предварительной повестки дня. Обзор Механизма обеспечения готовности к пандемическому гриппу. Доклад Генерального директора. Женева: Всемирная организация здравоохранения; 2016 г. (https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB140/B140_16-ru.pdf, по состоянию на 11 января 2021 г.).
66. Рекомендации в отношении стратегии лабораторного тестирования на COVID-19. Копенгаген: Европейское региональное бюро ВОЗ; 2020 г. (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/331732>, по состоянию на 11 января 2021 г.).
67. Guidance for laboratories shipping specimens to WHO reference laboratories that provide confirmatory testing for COVID-19 virus. Geneva: World Health Organization; 2020 (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/331639>, по состоянию на 4 декабря 2020 г.).
68. Molecular assays to diagnose COVID-19: summary table of available protocols. Geneva: World Health Organization; 2020 (<https://www.who.int/who-documents-detail/molecular-assays-to-diagnose-covid-19-summary-table-of-available-protocols>, по состоянию на 4 декабря 2020 г.).
69. Fact sheet: genetic sequence data and databases. Geneva: World Health Organization; 2018 (https://www.who.int/influenza/pip/GSD_EN_V2_10Sep2018.pdf?ua=1, по состоянию на 11 декабря 2020 г.).
70. medRxiv: The Preprint Server for Health Sciences (<https://www.medrxiv.org/>, по состоянию на 1 ноября 2020 г.).
71. bioRxiv: The Preprint Server for Biology (<https://www.biorxiv.org/>, по состоянию на 1 ноября 2020 г.).
72. Virological (<https://virological.org/>, по состоянию на 1 ноября 2020 г.).
73. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen Y-M, Wang W, Song Z-G, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature.* 2020;579:265–9. doi: 10.1038/s41586-020-2008-3.
74. Lu J, du Plessis L, Liu Z, Hill V, Kang M, Lin H, et al. Genomic epidemiology of SARS-CoV-2 in Guangdong Province, China. *Cell.* 2020;181:997–1003.e9. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.023.
75. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579:270–3. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.
76. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020;25. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
77. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases by RT-PCR. Hong Kong University Medical School; 2020 (https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/peiris-protocol-16-1-20.pdf?sfvrsn=af1aac73_4, accessed 1 December 2020).
78. Melén K, Kakkola L, He F, Airenne K, Vapalahti O, Karlberg H, et al. Production, purification and immunogenicity of recombinant Ebola virus proteins: a comparison of Freund's adjuvant and adjuvant system 03. *J Virol Methods.* 2017;242:35–45. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.12.014.
79. Draft landscape of COVID-19 candidate vaccines. Geneva: World Health Organization (<https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>, по состоянию на 26 июня 2020 г.).
80. Ren Y, Zhou Z, Liu J, Lin L, Li S, Wang H, et al. A strategy for searching antigenic regions in the SARS-CoV spike protein. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2003;1:207–15. doi: 10.1016/s1672-0229(03)01026-x.
81. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N Engl J Med.* 2020;382:1199–207. doi: 10.1056/NEJMoa2001316.
82. Andersen K. Clock and TMRCA based on 27 genomes. Scripps Research; 2020 (<https://virological.org/t/clock-and-tmrca-based-on-27-genomes/347>, по состоянию на 26 июня 2020 г.).

83. Report of the WHO–China Joint Mission on coronavirus disease 2019 (COVID-19). Geneva: World Health Organization; 2020 ([https://www.who.int/publications-detail-redirect/report-of-the-who-china-joint-mission-on-coronavirus-disease-2019-\(covid-19\)](https://www.who.int/publications-detail-redirect/report-of-the-who-china-joint-mission-on-coronavirus-disease-2019-(covid-19)), по состоянию на 15 июля 2020 г.).
84. Cui J, Li F, Shi Z-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17:181–92. doi: 10.1038/s41579-018-0118-9.
85. Grenfell BT, Pybus OG, Gog JR, Wood JLN, Daly JM, Mumford JA, et al. Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens. *Science.* 2004;303:327–32. doi: 10.1126/science.1090727.
86. Volz EM, Koelle K, Bedford T. Viral phylodynamics. *PLoS Comput Biol.* 2013;9. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002947.
87. Pybus OG, Rambaut A. Evolutionary analysis of the dynamics of viral infectious disease. *Nat Rev Genet.* 2009;10:540–50. doi: 10.1038/nrg2583.
88. Lai A, Bergna A, Caucci S, Clementi N, Vicenti I, Dragoni F, et al. Molecular tracing of SARS-CoV-2 in Italy in the first three months of the epidemic. *Viruses.* 2020;12. doi: 10.3390/v12080798.
89. Fauver JR, Petrone ME, Hodcroft EB, Shioda K, Ehrlich HY, Watts AG, et al. Coast-to-coast spread of SARS-CoV-2 during the early epidemic in the United States. *Cell.* 2020;181:990–6.e5. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.021.
90. Candido DdS, Claro IM, Jesus dJG, Souza dWMM, Moreira FRR, Dellicour S, et al. Evolution and epidemic spread of SARS-CoV-2 in Brazil. *Science.* 2020;369:1255–60. doi: 10.1101/2020.06.11.20128249.
91. Lemey P, Hong S, Hill V, Baele G, Poletto C, Colizza V, et al. Accommodating individual travel history, global mobility, and unsampled diversity in phylogeography: a SARS-CoV-2 case study. *bioRxiv.* 2020. doi: 10.1101/2020.06.22.165464.
92. Lemey P, Rambaut A, Bedford T, Faria N, Bielejec F, Baele G, et al. Unifying viral genetics and human transportation data to predict the global transmission dynamics of human influenza H3N2. *PLoS Pathog.* 2014;10:e1003932. doi: 10.1371/journal.ppat.1003932.
93. Dudas G, Carvalho LM, Bedford T, Tatem AJ, Baele G, Faria NR, et al. Virus genomes reveal factors that spread and sustained the Ebola epidemic. *Nature.* 2017;544:309–15. doi: 10.1038/nature22040.
94. Dellicour S, Baele G, Dudas G, Faria NR, Pybus OG, Suchard MA, et al. Phylodynamic assessment of intervention strategies for the West African Ebola virus outbreak. *Nat Commun.* 2018;9:1–9. doi: 10.1038/s41467-018-03763-2.
95. Lemey P, Rambaut A, Drummond AJ, Suchard MA. Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS Comput Biol.* 2009;5:e1000520. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000520.
96. Lemey P, Rambaut A, Welch JJ, Suchard MA. Phylogeography takes a relaxed random walk in continuous space and time. *Mol Biol Evol.* 2010;27:1877–85. doi: 10.1093/molbev/msq067.
97. Bloomquist EW, Lemey P, Suchard MA. Three roads diverged? Routes to phylogeographic inference. *Trends Ecol Evol.* 2010;25:626–32. doi: 10.1016/j.tree.2010.08.010.
98. Faria NR, Suchard MA, Rambaut A, Lemey P. Towards a quantitative understanding of viral phylogeography. *Curr Opin Virol.* 2011;1:423–9. doi: 10.1016/j.coviro.2011.10.003.
99. Lemey P, Hong S, Hill V, Baele G, Poletto C, Colizza V, et al. Accommodating individual travel history, global mobility, and unsampled diversity in phylogeography: A SARS-CoV-2 case study. *bioRxiv.* 2020:165464. doi: 10.1101/2020.06.22.165464.
100. Reusken CB, Buiting A, Bleeker-Rovers C, Diederer B, Hooiveld M, Friesema I, et al. Rapid assessment of regional SARS-CoV-2 community transmission through a convenience sample of healthcare workers, the Netherlands, March 2020. *Euro Surveill.* 2020;25. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.12.2000334.
101. Worry CJ, Lipsitch M, Hanage WP. Shared genomic variants: identification of transmission routes using pathogen deep-sequence data. *Am J Epidemiol.* 2017;186:1209–16. doi: 10.1093/aje/kwx182.
102. Duchene S, Featherstone L, Haritopoulou-Sinanidou M, Rambaut A, Lemey P, Baele G. Temporal signal and the phylodynamic threshold of SARS-CoV-2. *bioRxiv.* 2020:077735. doi: 10.1101/2020.05.04.077735.
103. Volz E, Fu H, Wang H, Xi X, Chen W, Liu D, et al. Genomic epidemiology of a densely sampled COVID19 outbreak in China. *medRxiv.* 2020:20033365. doi: 10.1101/2020.03.09.20033365.
104. Bedford T, Greninger AL, Roychoudhury P, Starita LM, Famulare M, Huang M-L, et al. Cryptic transmission of SARS-CoV-2 in Washington State. *Science.* 2020;370:571–5. doi: 10.1101/2020.04.02.20051417.
105. Zehender G, Lai A, Bergna A, Meroni L, Riva A, Balotta C, et al. Genomic characterization and phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 in Italy. *J Med Virol.* 2020;92:1637–40. doi: 10.1002/jmv.25794.
106. Worobey MA-O, Pekar JA-O, Larsen BA-O, Nelson MA-O, Hill V, Joy JB, et al. The emergence of SARS-CoV-2 in Europe and North America. *Science.* 2020;370:564–70. doi: 10.1126/science.abc8169.
107. Asghar H, Diop OM, Weldegebriel G, Malik F, Shetty S, El Bassioni L, et al. Environmental surveillance for polioviruses in the Global Polio Eradication Initiative. *J Infect Dis.* 2014;210 Suppl 1:S294–303. doi: 10.1093/infdis/jiu384.
108. Paul JR, Trask JD, Gard S. Ii. Poliomyelitic virus in urban sewage. *J Exp Med.* 1940;71:765–77. doi: 10.1084/jem.71.6.765.
109. Nemudryi A, Nemudraia A, Wiegand T, Surya K, Buyukyoruk M, Cicha C, et al. Temporal detection and phylogenetic assessment of SARS-CoV-2 in municipal wastewater. *Cell Rep Med.* 2020;1:100098. doi: 10.1016/j.xcrm.2020.100098.
110. Wu F, Zhang J, Xiao A, Gu X, Lee WL, Armas F, et al. SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. *mSystems.* 2020;5. doi: 10.1128/mSystems.00614-20.
111. Ahmed W, Angel N, Edson J, Bibby K, Bivins A, O'Brien JW, et al. First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: a proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *Sci Total Environ.* 2020;728:138764. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.138764.
112. Wurtzer SMV, Mouchel JM, Maday Y, Teyssou R, Richard E, Almayrac JL, Moulin L. Evaluation of lockdown impact on SARS-CoV-2 dynamics through viral genome quantification in Paris wastewaters. *medRxiv.* 2020. doi: 10.1101/2020.04.12.20062679.
113. La Rosa G, Iaconelli M, Mancini P, Bonanno Ferraro G, Veneri C, Bonadonna L, et al. First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy. *Sci Total Environ.* 2020;736:139652. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139652.
114. Gertjan Medema LH, Goffe Elsinga, Ronald Italiaander, Anke Brouwer. Presence of SARS-coronavirus-2 RNA in sewage and correlation with reported COVID-19 prevalence in the early stage of the epidemic in the Netherlands. *Environ Sci Technol Lett.* 2020. doi: 10.1021/acs.estlett.0c00357.

115. Lodder W, de Roda Husman AM. SARS-CoV-2 in wastewater: potential health risk, but also data source. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2020;5:533–4. doi: 10.1016/S2468-1253(20)30087-X.
116. Положение дел в области санитарно-эпидемиологического надзора за состоянием окружающей среды на предмет выявления вируса SARS-CoV-2. Научная справка. Женева: Всемирная организация здравоохранения; 2020 г. (https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/333670/WHO-2019-nCoV-Sci_Brief-EnvironmentalSampling-2020.1-rus.pdf, по состоянию на 11 января 2021 г.).
117. Rapid expert consultation on environmental surveillance of SARS-CoV-2 in wastewater: summary report. Geneva: World Health Organization; 2020 (<https://www.euro.who.int/en/health-topics/environment-and-health/water-and-sanitation/publications/2020/rapid-expert-consultation-on-environmental-surveillance-of-sars-cov-2-in-wastewater-summary-report-2020>, по состоянию на 12 декабря 2020 г.).
118. Edridge AWD, Kaczorowska JM, Hoste ACR, Bakker M, Klein M, Jebbink MF, et al. Coronavirus protective immunity is short lasting. *medRxiv*. 2020. doi: 10.1101/2020.05.11.20086439.
119. To KK, Hung IF, Ip JD, Chu AW, Chan WM, Tam AR, et al. COVID-19 re-infection by a phylogenetically distinct SARS-coronavirus-2 strain confirmed by whole genome sequencing. *Clin Infect Dis*. 2020. doi: 10.1093/cid/ciaa1275.
120. Goldman JD, Wang K, Roltgen K, Nielsen SCA, Roach JC, Naccache SN, et al. Reinfection with SARS-CoV-2 and failure of humoral immunity: a case report. *medRxiv*. 2020. doi: 10.1101/2020.09.22.20192443.
121. Gupta V, Bhojar RC, Jain A, Srivastava S, Upadhayay R, Imran M, et al. Asymptomatic reinfection in two healthcare workers from India with genetically distinct SARS-CoV-2. *Clin Infect Dis*. 2020. doi: 10.1093/cid/ciaa1451.
122. Mulder M, van der Vegt D, Oude Munnink BB, GeurtsvanKessel CH, van de Bovenkamp J, Sikkema RS, et al. Reinfection of SARS-CoV-2 in an immunocompromised patient: a case report. *Clin Infect Dis*. 2020. doi: 10.1093/cid/ciaa1538.
123. Tillett RL, Sevinsky JR, Hartley PD, Kerwin H, Crawford N, Gorzalski A, et al. Genomic evidence for reinfection with SARS-CoV-2: a case study. *Lancet Infect Dis*. 2020. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30764-7.
124. Van Elslande J, Vermeersch P, Vandervoort K, Wawina-Bokalanga T, Vanmechelen B, Wollants E, et al. Symptomatic SARS-CoV-2 reinfection by a phylogenetically distinct strain. *Clin Infect Dis*. 2020. doi: 10.1093/cid/ciaa1330.
125. Common investigation protocol for investigating suspected SARS-CoV-2 reinfection. Atlanta: United States Centers for Disease Control and Prevention; 2020 (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/php/reinfection.html>, по состоянию на 1 ноября 2020 г.).
126. Reinfection with SARS-CoV-2: considerations for public health response. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2020 (<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Re-infection-and-viral-shedding-threat-assessment-brief.pdf>, по состоянию на 1 ноября 2020 г.).
127. Emergencies preparedness, response: SARS-CoV-2 variants. Disease outbreak news. Geneva: World Health Organization; 31 December 2020 (<https://www.who.int/csr/don/31-december-2020-sars-cov2-variants/en/>, accessed 31 December 2020)
128. Baum A, Fulton BO, Wloga E, Copin R, Pascal KE, Russo V, et al. Antibody cocktail to SARS-CoV-2 spike protein prevents rapid mutational escape seen with individual antibodies. *Science*. 2020;369:1014–8. doi: 10.1126/science.abd0831.
129. Inzaule SC, Hamers RL, Paredes R, Yang C, Schuurman R, Rinke de Wit TF. The evolving landscape of HIV drug resistance diagnostics for expanding testing in resource-limited settings. *AIDS Rev*. 2017;19:219–30 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28182618>, по состоянию на 15 ноября 2020 г.).
130. Sepulveda N, Phelan J, Diez-Benavente E, Campino S, Clark TG, Hopkins H, et al. Global analysis of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein-2 (pfrhp2) and pfrhp3 gene deletions using whole-genome sequencing data and meta-analysis. *Infect Genet Evol*. 2018;62:211–9. doi: 10.1016/j.meegid.2018.04.039.
131. Cremer J, Hofstraat SHI, van Heiningen F, Veldhuijzen IK, van Benthem BHB, Benschop KSM. Genetic variation of Hepatitis B surface antigen among acute and chronic Hepatitis B virus infections in the Netherlands. *J Med Virol*. 2018;90:1576–85. doi: 10.1002/jmv.25232.
132. Hollinger FB. Hepatitis B virus genetic diversity and its impact on diagnostic assays. *J Viral Hepat*. 2007;14 Suppl 1:11–5. doi: 10.1111/j.1365-2893.2007.00910.x.
133. Lam SD, Bordin N, Waman VP, Scholes HM, Ashford P, Sen N, et al. SARS-CoV-2 spike protein predicted to form complexes with host receptor protein orthologues from a broad range of mammals. *Sci Rep*. 2020;10:16471. doi: 10.1038/s41598-020-71936-5.
134. Damas J, Hughes GM, Keough KC, Painter CA, Persky NS, Corbo M, et al. Broad host range of SARS-CoV-2 predicted by comparative and structural analysis of ACE2 in vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117:22311–22. doi: 10.1073/pnas.2010146117.
135. Freuling CM, Breithaupt A, Müller T, Sehl J, Balkema-Buschmann A, Rissmann M, et al. Susceptibility of raccoon dogs for experimental SARS-CoV-2. *bioRxiv*. 2020. doi: 10.1101/2020.08.19.256800v1.
136. Schlottau K, Rissmann M, Graaf A, Schon J, Sehl J, Wylezich C, et al. SARS-CoV-2 in fruit bats, ferrets, pigs, and chickens: an experimental transmission study. *Lancet Microbe*. 2020;1:e218–e25. doi: 10.1016/S2666-5247(20)30089-6.
137. Shi J, Wen Z, Zhong G, Yang H, Wang C, Huang B, et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science*. 2020;368:1016–20. doi: 10.1126/science.abb7015.
138. Kim YI, Kim SG, Kim SM, Kim EH, Park SJ, Yu KM, et al. Infection and rapid transmission of SARS-CoV-2 in ferrets. *Cell Host Microbe*. 2020;27:704–9 e2. doi: 10.1016/j.chom.2020.03.023.
139. Halfmann PJ, Hatta M, Chiba S, Maemura T, Fan S, Takeda M, et al. Transmission of SARS-CoV-2 in domestic cats. *N Engl J Med*. 2020;383:592–4. doi: 10.1056/NEJMc2013400.
140. Ruiz-Arrondo I, Portillo A, Palomar AM, Santibanez S, Santibanez P, Cervera C, et al. Detection of SARS-CoV-2 in pets living with COVID-19 owners diagnosed during the COVID-19 lockdown in Spain: a case of an asymptomatic cat with SARS-CoV-2 in Europe. *Transbound Emerg Dis*. 2020. doi: 10.1111/tbed.13803.
141. Richard M, Kok A, de Meulder D, Bestebroer TM, Lamers MM, Okba NMA, et al. SARS-CoV-2 is transmitted via contact and via the air between ferrets. *Nat Commun*. 2020;11:3496. doi: 10.1038/s41467-020-17367-2.
142. Sia SF, Yan LM, Chin AWH, Fung K, Choy KT, Wong AYL, et al. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature*. 2020. doi: 10.1038/s41586-020-2342-5.

143. Munster VJ, Feldmann F, Williamson BN, van Doremalen N, Pérez-Pérez L, Schulz J, et al. Respiratory disease and virus shedding in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2. medRxiv. 2020. doi: 10.1101/2020.03.21.001628v1.
144. Zhao Y, Wang J, Kuang D, Xu J, Yang M, Ma C, et al. Susceptibility of tree shrew to SARS-CoV-2 infection. Sci Rep. 2020;10:16007. doi: 10.1038/s41598-020-72563-w.
145. Woolsey C, Borisevich V, Prasad AN, Agans KN, Deer DJ, Dobias NS, et al. Establishment of an African green monkey model for COVID-19. bioRxiv. 2020. doi: 10.1101/2020.05.17.100289.
146. Lu S, Zhao Y, Yu W, Yang Y, Gao J, Wang J, et al. Comparison of nonhuman primates identified the suitable model for COVID-19. Signal Transduct Target Ther. 2020;5:157. doi: 10.1038/s41392-020-00269-6.
147. Sit THC, Brackman CJ, Ip SM, Tam KWS, Law PYT, To EMW, et al. Infection of dogs with SARS-CoV-2. Nature. 2020. doi: 10.1038/s41586-020-2334-5.
148. Newman A, Smith D, Ghai RR, Wallace RM, Torchetti MK, Loiacono C, et al. First reported cases of SARS-CoV-2 infection in companion animals - New York, March–April 2020. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2020;69:710–3. doi: 10.15585/mmwr.mm6923e3.
149. Oreshkova N, Molenaar RJ, Vreman S, Harders F, Oude Munnink BB, Hakze-van der Honing RW, et al. SARS-CoV-2 infection in farmed minks, the Netherlands, April and May 2020. Euro Surveill. 2020;25. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.23.2001005.
150. Cahan E. COVID-19 hits U.S. mink farms after ripping through Europe. Science Magazine. 2020 (<https://www.sciencemag.org/news/2020/08/covid-19-hits-us-mink-farms-after-ripping-through-europe>, по состоянию на 13 ноября 2020 г.).
151. Abdel-Moneim AS, Abdelwhab EM. Evidence for SARS-CoV-2 infection of animal hosts. Pathogens. 2020;9. doi: 10.3390/pathogens9070529.
152. Exposure of humans or animals to SARS-CoV-2 from wild, livestock, companion and aquatic animals. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2020 (<http://www.fao.org/3/ca9959en/ca9959en.pdf>, по состоянию на 1 декабря 2020 г.).
153. Guidelines to mitigate the impact of the COVID-19 pandemic on livestock production and animal health. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2020 (<http://www.fao.org/3/ca9177en/CA9177EN.pdf>, по состоянию на 1 декабря 2020 г.).
154. Guidance on working with farmed animals of species susceptible to infection with SARS-CoV-2. Paris: World Organisation for Animal Health (OIE); 2020 (https://www.oie.int/fileadmin/Home/MM/Draft_OIE_Guidance_farmed_animals_cleanMS05.11.pdf, по состоянию на 8 декабря 2020 г.).
155. El Zowalaty ME, Jarhult JD. From SARS to COVID-19: a previously unknown SARS-related coronavirus (SARS-CoV-2) of pandemic potential infecting humans: call for a One Health approach. One Health. 2020;9:100124. doi: 10.1016/j.onehlt.2020.100124.
156. Leroy EM, Ar Gouilh M, Brugere-Picoux J. The risk of SARS-CoV-2 transmission to pets and other wild and domestic animals strongly mandates a One-Health strategy to control the COVID-19 pandemic. One Health. 2020;10:100133. doi: 10.1016/j.onehlt.2020.100133.
157. Guidelines for working with free-ranging wild mammals in the era of the COVID-19 pandemic. Paris: World Organisation for Animal Health (OIE); 2020 (https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/COV-19/A_WHSG_and_OIE_COVID-19_Guidelines.pdf, по состоянию на 10 декабря 2020 г.).

Приложение I. Ключевые вопросы, на которые необходимо ответить до начала осуществления программы секвенирования

- (1) Каковы ожидаемые результаты программы секвенирования?
- (2) Какие образцы необходимо секвенировать для достижения ожидаемых результатов? Какие метаданные или дополнительные источники данных имеют решающее значение?
- (3) Кто входит в число заинтересованных сторон и каковы сферы их ответственности? Как обеспечить их эффективное участие в процессе?
- (4) Как в необходимых случаях организовать оперативное распространение образцов и информации между заинтересованными сторонами?
- (5) Разработан ли проект в соответствии с местными, национальными и международными законами и с соблюдением этических принципов?
- (6) Имеются ли достаточные финансовые средства, оборудование и людские ресурсы для проведения всех этапов отбора образцов, лабораторных процедур секвенирования, биоинформационного, филогенетического и других видов анализа, обмена данными и своевременной передачи результатов заинтересованным сторонам?
- (7) Как достичь поставленных целей, не создавая препятствий для других направлений лабораторной работы, таких как клиническая диагностика, и избегая дублирования усилий?
- (8) Как будет проводиться оценка программы на предмет экономической эффективности и полезного воздействия?

Приложение II. Контрольный перечень мероприятий по организации программы секвенирования SARS-CoV-2

Цели

- Определите цели, стоящие перед программой секвенирования; какую информацию может предоставить секвенирование в дополнение к другим существующим подходам или с большей эффективностью в сравнении с затратами?

Выявление и привлечение заинтересованных сторон

- Составьте перечень ключевых действующих лиц.
- Обсудите цели программы со старшими представителями групп заинтересованных сторон и определите обязанности каждой группы.
- Предусмотрите возможность обмена учебными материалами о потенциале и требованиях в отношении секвенирования SARS-CoV-2 с заинтересованными сторонами.
- Определите каналы сотрудничества между ключевыми заинтересованными сторонами, необходимые для обеспечения оперативного перемещения образцов, направления запросов на информацию и использования результатов.
- Обеспечьте установление четких и надежных связей между заинтересованными сторонами.

Технические соображения

- В консультации со старшими членами групп по выявлению случаев и анализу определите уровень геномной выборки, необходимый для достижения поставленных целей.
- В консультации со старшими членами групп по выявлению случаев и анализу определите метаданные, необходимые для достижения поставленных целей.
- Выберите соответствующие протоколы подготовки образцов и библиотек.
- Выберите соответствующие биоинформационные протоколы.
- Выберите соответствующие аналитические протоколы.

Логистические соображения

- Определите, где будет проводиться секвенирование и анализ (например, в корпоративной диагностической лаборатории или в привлеченной коммерческой или академической лаборатории).
- Определите источники финансирования, необходимого для обеспечения лабораторного секвенирования, хранения и анализа данных.
- Обеспечьте наличие достаточного количества реагентов и компьютерных мощностей и устойчивое снабжение этими материалами и оборудованием по мере необходимости.
- Обеспечьте наличие людских ресурсов достаточной численности и обладающих необходимой квалификацией для осуществления программы на каждом ее этапе.
- Убедитесь в том, что на всех этапах процесса обеспечивается надлежащее состояние образцов посредством поддержания холодной цепи или принятия других необходимых мер.
- Обеспечьте надлежащий сбор и хранение метаданных и их достоверную привязку к биологическим образцам.
- Предусмотрите возможность дополнительной нагрузки, которую создаст секвенирование для действующих служб общественного здравоохранения, и постарайтесь ее снизить.
- Для крупномасштабных программ секвенирования определите пути оптимизации обмена данными и образцами между участвующими группами (например, оцените возможность использования идентификации по единственному образцу и идентичных форматов метаданных).

Обеспечение безопасной и этичной среды

- Проведите надлежащую этическую оценку процессов генерирования, использования и хранения данных о последовательностях и связанных с ними метаданных.
- Выполните оценку рисков, связанных с процедурами секвенирования, для обеспечения надлежащей биобезопасности на всех этапах.
- Выполните оценку рисков, связанных с процедурами секвенирования, для обеспечения надлежащей биозащищенности в соответствии с национальным и региональным законодательством.
- Рассмотрите кадровые последствия, включая необходимость перераспределения персонала или найма дополнительных работников для поддержания индивидуальной рабочей нагрузки на разумном уровне.
- Обеспечьте, чтобы персонал мог ездить на работу и находиться на рабочем месте безопасно и в соответствии с национальными руководящими принципами по предотвращению передачи инфекции во время вспышки COVID-19.
- Определите необходимые меры для поддержания программы секвенирования, если ключевые сотрудники заболевают или вынуждены самоизолироваться.

Обмен данными

- Убедитесь, что все заинтересованные стороны пришли к согласию относительно того, какие последовательности и метаданные поступят в открытый доступ, через какие платформы и когда.
- Убедитесь, что все заинтересованные стороны пришли к согласию относительно того, следует ли предоставить доступ к тем или иным метаданным лишь для ограниченного числа местных пользователей, и разработайте стратегии безопасной передачи таких данных.
- Обеспечьте, чтобы механизмы обмена данными соответствовали национальным и международным правовым нормам.

Оценка эффективности программы

- Создайте возможности для регулярного проведения оценки эффективности программы секвенирования, включая успехи и сохраняющиеся проблемы.
- Обеспечьте внедрение системы мониторинга и оценки для определения эффективности программы секвенирования как по техническим показателям (качество и др.), так и по показателям успешности в достижении поставленных целей.

Приложение III. Широко используемые платформы для анализа секвенирования SARS-CoV-2 и их характеристики

Инструмент ^а	Преимущества	Недостатки	Длительность рабочего цикла	Пропускная мощность	Сравнение затрат
Метод Сэнгера	Широко доступен Прост в использовании Низкозатратное секвенирование, если требуется небольшое число мишеней	Крайне низкая пропускная способность Ампликоны (часто не более 1000 пн) должны быть индивидуально амплифицированы и секвенированы Дорогостоящий метод для анализа полных геномов Не подходит для метагеномики	Обычно несколько часов	100 Кб – 2 Мб за один прогон	Относительно невысокая стоимость при использовании немногочисленных мишеней
Метод Illumina (например, iSeq, MiniSeq, MiSeq, NextSeq, HiSeq, NovaSeq)	Можно достичь крайне высоких показателей производительности (выхода) секвенирования Очень высокая точность Секвенаторы iSeq портативны Методы обработки данных четко установлены	Высокая стоимость приобретения и обслуживания аппаратуры, за исключением Illumina iSeq, по сравнению с некоторыми другими платформами Максимальная длина считывания 2 x 300 пн	10–55 ч, в зависимости от прибора	1,2–6000 Гб, в зависимости от прибора	Высокая стоимость пусконаладочных работ и технического обслуживания Умеренные эксплуатационные расходы
Oxford Nanopore Technologies (Flongle, MinION, GridION, PromethION)	Портативная аппаратура, прямое секвенирование Получение данных в режиме реального времени Низкая стоимость пусконаладочных работ и технического обслуживания Можно прекратить секвенирование, как только будет получен достаточный объем данных Достижима крайне высокая длина считывания (превышающая полную длину генома SARS-CoV-2)	Трудности со считыванием гомополимерных участков Частота ошибок считывания составляет ≈5% (при использовании проточных ячеек R9.4), поэтому для получения высокоточных консенсусных последовательностей решающее значение имеет применение надлежащих биоинформационных алгоритмов В настоящее время метод пригоден для определения внутривидовых вариаций только при использовании репликативного секвенирования (52)	Результаты доступны немедленно Процесс считывания и наблюдения по мере необходимости можно продолжать в течение ряда дней	От < 2 Гб для проточных ячеек Flongle до 220 Гб для PromethION На PromethION можно использовать до 48 проточных ячеек	Не требуется техническое обслуживание, низкие затраты на запуск прибора Умеренные эксплуатационные расходы
Ion Torrent	Короткий рабочий цикл секвенирования	Трудности со считыванием гомополимерных участков Дорогостоящая аппаратура В типичных случаях максимальная длина считывания около 400 пн	2 часа – 1 день, в зависимости от чипа и устройства	30 Мб–50 Гб в зависимости от чипа и устройства	Умеренная стоимость

^а Настоящий перечень содержит обзор наиболее часто используемых инструментов для секвенирования генома SARS-CoV-2. Упоминание определенных приборов не означает, что они одобрены или рекомендованы ВОЗ.

^б Различные оценки уровней затрат можно найти в публикации ВОЗ (8).

ВОЗ продолжает проводить тщательный мониторинг ситуации в целях своевременного выявления любых изменений, которые могут оказывать влияние на данные временные рекомендации. При возникновении таких изменений ВОЗ выпустит следующую обновленную версию. В противном случае срок действия настоящего временного руководящего документа истекает через 2 года после даты его опубликования.

© Всемирная организация здравоохранения, 2021. Некоторые права защищены. Данная работа распространяется на условиях лицензии [CC BY-NC-SA 3.0 IGO](#).

WHO reference number: [WHO/2019-nCoV/genomic_sequencing/2021.1](#)