

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

*Μοριακή τυποποίηση παραλλαγών ανησυχίας SARS-CoV-2 (variants of concern) σε στελέχη που απομονώθηκαν από δείγματα ανωτέρου αναπνευστικού στο Βιοπαθολογικό Εργαστήριο του Αιγινητείου Νοσοκομείου κατά την περίοδο από Μάιο 2020 έως Μάρτιο 2022*



Πετεινάκης Ανδρέας, προπτυχιακός φοιτητής  
τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,  
ΙΟΥΝΙΟΣ 2022

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκονήθηκε στο βιοπαθολογικό εργαστήριο του Αιγινήτειου Νοσοκομείου, υπό την επίβλεψη του καθηγητή Χατζηπαναγιώτου Στυλιανού, αναπληρωτή καθηγητή Μικροβιολογίας στο Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Μετά την ολοκλήρωση της πτυχιακής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους επιβλέποντες καθηγητές μου. Τον κύριο Στυλιανό Χατζηπαναγιώτου που μου έδωσε τη δυνατότητα να ασχοληθώ με ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον και επίκαιρο θέμα καθώς και για τη βοήθεια του καθόλη τη διάρκεια της εργασίας. Την κυρία Άννα Μαρία Ψαρρά που ενέκρινε το θέμα και δέχτηκε να συνεργαστεί μαζί μου στο συγκεκριμένο αντικείμενο. Και τέλος, την κυρία Ευθυμία Πετεινάκη, της οποίας οι γνώσεις ήταν πολύτιμες για την εκπόνηση της εργασίας.

#### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- Χατζηπαναγιώτου Στυλιανός, Αναπληρωτής Καθηγητής Μικροβιολογίας, Ε.Κ.Π.Α., Ιατρός-Βιοπαθολόγος, Κλινικός Μικροβιολόγος
- Ψαρρά Άννα Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Πετεινάκη Ευθυμία, Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας - Κλινικής Μικροβιολογίας Καθηγήτρια της Ιατρικής Βιοπαθολογίας - Κλινικής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### ΜΕΡΟΣ Α': Γενικό (Ενότητες 1, 2)

Περίληψη.....	4
1. Εισαγωγή.....	6
1.1 Έναρξη και εξάπλωση.....	7
1.2 Δομή και μορφολογία SARS-CoV-2.....	10
1.3 Ιικά στελέχη – RNA ιοί.....	17
1.4 Μεταλλάξεις SARS-CoV-2.....	18
1.5 Διασπορά SARS-CoV-2.....	25
2. Παραλλαγές SARS-COV-2.....	28
2.1: Παραλλαγές γενικά.....	28
2.2 Είδη παραλλαγών SARS-COV-2.....	29
2.3 Τύποι παραλλαγών ανησυχίας SARS-CoV-2 (Variants of concern).....	31
2.4 Τύποι παραλλαγών ενδιαφέροντος (Variants of interest).....	36

### ΜΕΡΟΣ Β': Ειδικό (Ενότητα 3)

3. Μοριακή ταυτοποίηση παραλλαγών στελεχών του SARS-CoV-2.....	38
3.1 Σκοπός της μελέτης.....	40
3.2 Υλικό και μέθοδος.....	41
3.3 Περιγραφή μεθόδου.....	43
3.4 Στατιστική ανάλυση – αποτελέσματα.....	46
Συζήτηση.....	48
Βιβλιογραφία.....	49

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κατά την πορεία της πανδημίας, ολοένα και πιο συχνά, νέες παραλλαγές του συνδρόμου σοβαρής οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας του κορονοϊού 2 (SARS-CoV-2) εμφανίζονται σε όλο τον κόσμο. Προκαλούν δε έντονη ανησυχία για τη δυνητική ικανότητά τους να κυριαρχούν και ενίοτε να ξεφεύγουν από τη φυσική ή την επαγόμενη από το εμβόλιο ανοσία και τις διαθέσιμες θεραπείες. Στη μελέτη αυτή θα εξετάσουμε εν συντομία τις παραλλαγές ειδικού ενδιαφέροντος του SARS-CoV-2 (variants of concern) που παρατηρήθηκαν από την αρχή της πανδημίας μέχρι και σήμερα. Συγκεκριμένα, θα συγκρίνουμε διάφορους τύπους παραλλαγών σε έναν πληθυσμό ατόμων που είχαν μολυνθεί από τον ιό στο νοσοκομείο ΑΙΓΙΝΗΤΕΙΟ από τον Μάιο 2020 έως και τον Μάρτιο 2022. Τα δείγματα των ασθενών υποβλήθηκαν σε ειδικές τεχνικές μοριακής τυποποίησης για τον εντοπισμό των παραλλαγών του αρχικού στελέχους. Η τυποποίηση αυτή θα μας οδηγήσει σε χρήσιμα συμπεράσματα για τις εμφανιζόμενες παραλλαγές, τα οποία και θα συζητήσουμε.

## **ABSTRACT**

During the route of the pandemic, new variants of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) are appearing all over the world. There is a wide concern about their potential ability to dominate and sometimes escape natural or vaccine-induced immunity and available therapies. In this study we will focus on the variants of concern/interest of SARS-CoV-2 that have been observed from the beginning of the pandemic till today. Specifically, we will compare different types of variants in a population of individuals infected with the virus at AIGINITIO hospital from May 2020 to March 2022. Patients' samples underwent special techniques of molecular identification in order to identify variants of the original strain. This typing will lead us to useful conclusions about the current variants, which we are going to discuss.

## **A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Οι κορονοϊοί είναι μια ιδιαίτερη ομάδα ιών που μπορεί να μολύνουν διάφορα ζώα αλλά και τον άνθρωπο και να προκαλέσουν από ήπιες έως σοβαρές λοιμώξεις του αναπνευστικού. Το 2002 και το 2012, δύο εξαιρετικά παθογόνοι κορονοϊοί με ζωνοσογόνο προέλευση, ο SARS-CoV (severe acute respiratory syndrome coronavirus) και ο MERS-CoV (Middle East respiratory syndrome coronavirus) αντίστοιχα, μόλυναν ανθρώπους και προκάλεσαν θανατηφόρες αναπνευστικές ασθένειες, καθιστώντας τους κορονοϊούς αυτούς απειλητικούς για τη δημόσια υγεία<sup>1</sup>. Στα τέλη του 2019 στην πόλη Wuhan της Κίνας, εμφανίστηκε ένας νέος κορονοϊός, ο SARS-CoV-2 που προκάλεσε ένα ξέσπασμα ασυνήθιστης ιογενούς πνευμονίας. Όντας εξαιρετικά μεταδοτική αυτή η νέα ασθένεια, γνωστή ως COVID-19 (coronavirus disease 2019), εξαπλώθηκε γρήγορα σε πολλές χώρες<sup>2,3</sup>. Έχει ξεπεράσει συντριπτικά τον SARS-CoV και τον MERS-CoV τόσο ως προς τον αριθμό των μολυσμένων ατόμων όσο και ως προς την έκταση των περιοχών επιδημίας. Η έξαρση της νόσου COVID-19 συνεχίζει να αποτελεί μεγάλη απειλή για την δημόσια υγεία παγκοσμίως<sup>4,5</sup>.

## *Έναρξη και εξάπλωση*

Τον Δεκέμβριο 2019 σε αρκετές ερευνητικές εγκαταστάσεις υγείας στο Wuhan της επαρχίας Hubei της Κίνας, αναφέρονται περιστατικά ασθενών με πνευμονία άγνωστης αιτίας πολύ μεταδοτικής – η καταγραφή του πρώτου κρούσματος χρονολογείται στις 8 Δεκεμβρίου 2019 <sup>6,9</sup>. Ομοίως με τους ασθενείς που είχαν νοσήσει με τους ιούς SARS-CoV και MERS-CoV, οι ασθενείς εμφανίζουν συμπτώματα ιογενούς πνευμονίας όπως πυρετό, βήχα, πόνο στο στήθος, δυσφορία και σε πιο σοβαρές περιπτώσεις δύσπνοια με αμφοτερόπλευρη διήθηση των πνευμόνων ακτινολογικά<sup>6,7</sup>. Μεταξύ των πρώτων νοσηλευόμενων ασθενών, τα περισσότερα κρούσματα συνδέονται επιδημιολογικά με μια αγορά στο κέντρο της Wuhan (Huanan Seafood Wholesale Market) η οποία εμπορεύεται θαλασσινά και ζωντανά ζώα<sup>4,8</sup>. Στις 31 Δεκεμβρίου, η Δημοτική Επιτροπή Υγείας της Wuhan ανακοινώνει το ξέσπασμα πνευμονίας αγνώστου αιτίας και ενημερώνει τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO)<sup>9</sup>.

Με απομόνωση του ιού από δείγματα βρογχοκυψελιδικού υγρού από ασθενείς με σοβαρή πνευμονία και στη συνέχεια μεταγονιδιωματική αλληλούχηση RNA, ανεξάρτητες ομάδες Κινέζων επιστημόνων εντοπίζουν ότι η νόσος οφείλεται σε έναν νεοεμφανιζόμενο κορονοϊό β (beta)<sup>6,10,11</sup>. Εξαρχής η διασπορά είναι μεγάλη σε κλειστούς και ανοικτούς χώρους και σε νοσηλευτήρια. Το γεγονός αυτό παρέχει ασφαλή στοιχεία για την εξαιρετική ικανότητα μετάδοσης του νέου ιού από άνθρωπο σε άνθρωπο<sup>4,12-14</sup>. Καθώς το ξέσπασμα συμπίπτει χρονολογικά με εορταστική περίοδο, οι μετακινήσεις μεταξύ των πόλεων γίνονται ανεξέλεγκτες και διευκολύνουν τη μετάδοση του ιού σε απομακρυσμένες περιοχές της χώρας. Σε έναν μήνα ο ιός έχει εξαπλωθεί μαζικά και στις 34 επαρχίες της Κίνας.

Στις 23 Ιανουαρίου η πόλη της Wuhan κλείνει τα σύνορα, όλα τα αεροπορικά ταξίδια - από και προς αυτήν - ακυρώνονται και οι συγκοινωνίες που συνδέουν την πόλη με άλλες τίθενται εκτός λειτουργίας.

Τις επόμενες δύο εβδομάδες όλες οι υπαίθριες δραστηριότητες και συγκεντρώσεις απαγορεύονται και οι δημόσιες εγκαταστάσεις κλείνουν

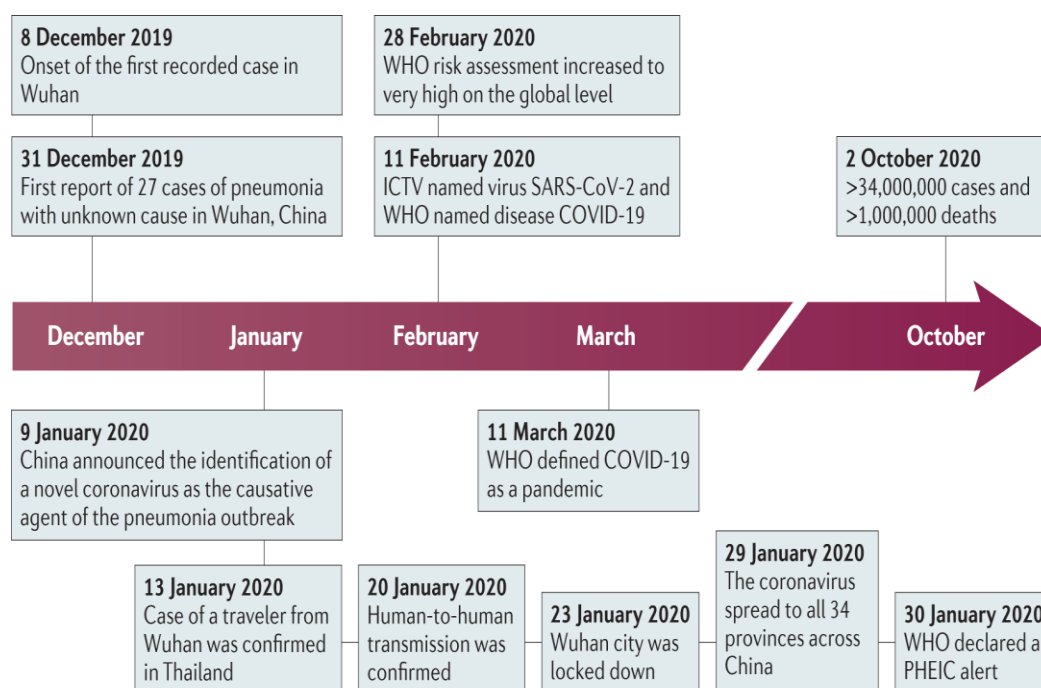
στις περισσότερες πόλεις της χώρας<sup>18</sup>. Ο συνολικός αριθμός κρουσμάτων αυξάνεται απότομα στις αρχές Φεβρουαρίου με μέσο ημερήσιο ρυθμό άνω των 3.000. Για τον έλεγχο της νόσου COVID-19 η Κίνα εφαρμόζει άνευ προηγουμένου αυστηρά μέτρα δημόσιας υγείας. Λόγω αυτών των μέτρων ο καθημερινός αριθμός νέων κρουσμάτων στην Κίνα αρχίζει να μειώνεται με σταθερό ρυθμό<sup>19</sup>.

Ωστόσο, παρά την πτωτική τάση στην Κίνα, η διασπορά της νόσου COVID-19 διεθνώς, επιταχύνεται ραγδαία στα τέλη Φεβρουαρίου. Μεγάλες ομάδες μόλυνσης έχουν αναφερθεί σε πολλές χώρες<sup>18</sup>. Η υψηλή μεταδοτικότητα του SARS-CoV-2 και η πληθώρα διεθνών διηπειρωτικών ταξιδιών συντελούν στην ταχεία εξάπλωση της νόσου παγκοσμίως. Στις 30 Ιανουαρίου 2020, ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας (ΠΟΥ) αναγνωρίζει την παρουσία του νέου κορονοϊού ως άμεση απειλή για τη δημόσια υγεία σε διεθνές επίπεδο<sup>16</sup>. Στις 11 Φεβρουαρίου, η Διεθνής Επιτροπή Ταξινόμησης Ιών ονομάζει τον νέο κορονοϊό «SARS-CoV-2» και ο ΠΟΥ την ασθένεια «COVID-19»<sup>17</sup>. Ένα μήνα αργότερα η νόσος COVID-19 αναγνωρίζεται επίσημα πλέον ως πανδημία<sup>20</sup>. Και ενώ τον Μάρτιο η κατάσταση στην Κίνα φαίνεται να ελέγχεται, οι αριθμοί των κρουσμάτων στην Ευρώπη και τις ΗΠΑ αυξάνονται δραματικά. Σύμφωνα με τον πίνακα ελέγχου της πανδημίας από το Πανεπιστήμιο Johns Hopkins, έως τις 11 Αυγούστου 2020, 216 χώρες και περιοχές και από τις έξι ηπείρους κατέγραψαν περισσότερα από 20 εκατομμύρια κρούσματα COVID-19 και περισσότερους από 733.000 ασθενείς που κατέληξαν<sup>21</sup>. Υψηλή θνησιμότητα παρατηρήθηκε ιδιαίτερα σε χώρες που οι πόροι υγειονομικής περίθαλψης ήταν ελλιπείς. Ως εκείνο το διάστημα, οι ΗΠΑ θεωρείται η χώρα με τον μεγαλύτερο αριθμό κρουσμάτων.

Αν και γενετικά στοιχεία υποδηλώνουν ότι ο SARS-CoV-2 είναι ένας φυσικά μεταλλαγμένος ιός που πιθανότατα προέρχεται από ζώα, δεν υπάρχει ακόμη συμπέρασμα για το πού, πώς και πότε εισήλθε ο ιός στους ανθρώπους πρώτη φορά. Καθώς ορισμένα από τα πρώτα καταγεγραμμένα κρούσματα στη Wuhan δεν είχαν επιδημιολογική σχέση με την αγορά θαλασσινών<sup>22</sup>, ενδέχεται η αγορά να μην αποτελεί την αρχική πηγή μόλυνσης του ανθρώπου με τον SARS-CoV-2. Σε μελέτη από τη Γαλλία αναφέρεται ότι ο SARS-CoV-2 ανιχνεύτηκε μέσω της μεθόδου PCR (Polymerase Chain Reaction) σε αποθηκευμένο δείγμα



ασθενούς από τα τέλη του 2019, υποδηλώνοντας ότι ο ιός μπορεί να είχε εξαπλωθεί εκεί πολύ νωρίτερα<sup>23</sup>. Ωστόσο, αυτή η μεμονωμένη αναφορά δεν είναι αρκετή για να δώσει μια σταθερή απάντηση όσον αφορά την προέλευση του SARS-CoV-2 και τη μόλυνση, και επομένως δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα ενός ψευδώς θετικού αποτελέσματος.



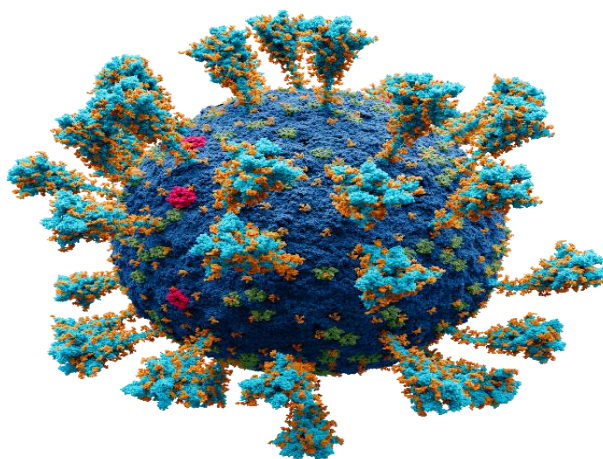
Εικ. 1: Χρονοδιάγραμμα των βασικών γεγονότων της επιδημίας COVID-19.

## ***Δομή και μορφολογία SARS-CoV-2***

Οι κορονοϊοί είναι ισωμάτια και φέρουν ικούς φακέλους. Η διάμετρος αυτών των ισωμάτων είναι 120 nm. Το νουκλεοκαψίδιο τους αποτελείται από πρωτεΐνες επικαλυμμένες με καψίδιο και εντοπίζεται μέσα στο γενετικό υλικό του ιού<sup>32</sup>. Ο κορονοϊός είναι RNA ιός και το γονιδίωμα του αποτελείται από μονόκλωνο θετικό RNA. Μέσα στο νουκλεοκαψίδιο, το γενετικό υλικό του ιού φαίνεται ως σπειροειδές ή κυκλικό. Το γονιδιωματικό RNA έχει μεθυλιωμένη κεφαλή στην 5' περιοχή και κατάλοιπα αδενίνης στο τελικό 3' άκρο του. Τμήμα του ικού γονιδιώματος κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που ονομάζεται ένζυμο ρεπλικάσης, η οποία μεταγράφει το γονιδίωμα του ιού και παράγει νέα αντίγραφα αξιοποιώντας τις ιδιότητες του κυττάρου ξενιστή<sup>33</sup>. Σύμφωνα με μελέτες, ο SARS-CoV-2 είναι μέλος του γένους του κορονοϊού βήτα και αποτελείται από τέσσερις δομικές πρωτεΐνες, το νουκλεοκαψίδιο (N), την ακίδα (S), τη μεμβράνη (M) και τον φάκελο (E). Οι πρωτεΐνες αυτές παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εισαγωγή του ιού στον ξενιστή και τον σχηματισμό των φακέλων<sup>34</sup>. Η πρωτεΐνη E είναι υπεύθυνη για τον πολλαπλασιασμό, την ανάπτυξη, τον σχηματισμό περιβλήματος και την εξάπλωση του ιού<sup>35</sup>. Η αύξηση των επιπέδων της μεταγραφής και η συρραφή του ικού γονιδιώματος είναι ευθύνη της πρωτεΐνης N<sup>36</sup>. Για τη σύνδεση του ιού με τα κύτταρα-ξενιστές, υπεύθυνη είναι η πρωτεΐνη Spike (S) και για αυτό η φαρμακευτική έρευνα εστιάζει σε αυτή. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι πρωτεΐνες N, M και E δεν συνιστούν δυνητικούς στόχους φαρμάκων λόγω της μη απόκρισής τους σε εξουδετερωτικά ή ανοσολογικά αντισώματα<sup>37</sup>.

Όπως και οι υπόλοιποι κορονοϊοί, ο ιός SARS-CoV-2 εμφανίζει σφαιρικό σχήμα και στην επιφάνεια του προεξέχουν γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες (γλυκοπρωτεΐνες «S»), που ονομάζονται ακίδες (spikes). Όταν παρατηρούμε τον SARS-CoV-2 στο μικροσκόπιο, γύρω από τον ιό οι γλυκοπρωτεΐνες S εμφανίζονται σαν μια στεφάνη (κορώνα). Οι γλυκοπρωτεΐνες S του SARS-CoV-2 προσδένονται στο μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης 2 (ACE2), έναν υποδοχέα που βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη των ανθρώπινων κυττάρων σε διάφορα όργανα. Ως απόρροια αυτής της πρόσδεσης, οι γλυκοπρωτεΐνες S υφίστανται μια δομική αλλαγή που επιτρέπει τη σύντηξη της μεμβράνης του ιού με την

ανθρώπινη κυτταρική μεμβράνη<sup>24</sup>. Έτσι, τα ιικά γονίδια μπορούν να εισέλθουν στα ανθρώπινα κύτταρα, να αντιγραφούν και να παράξουν περισσότερα ιικά σωματίδια.

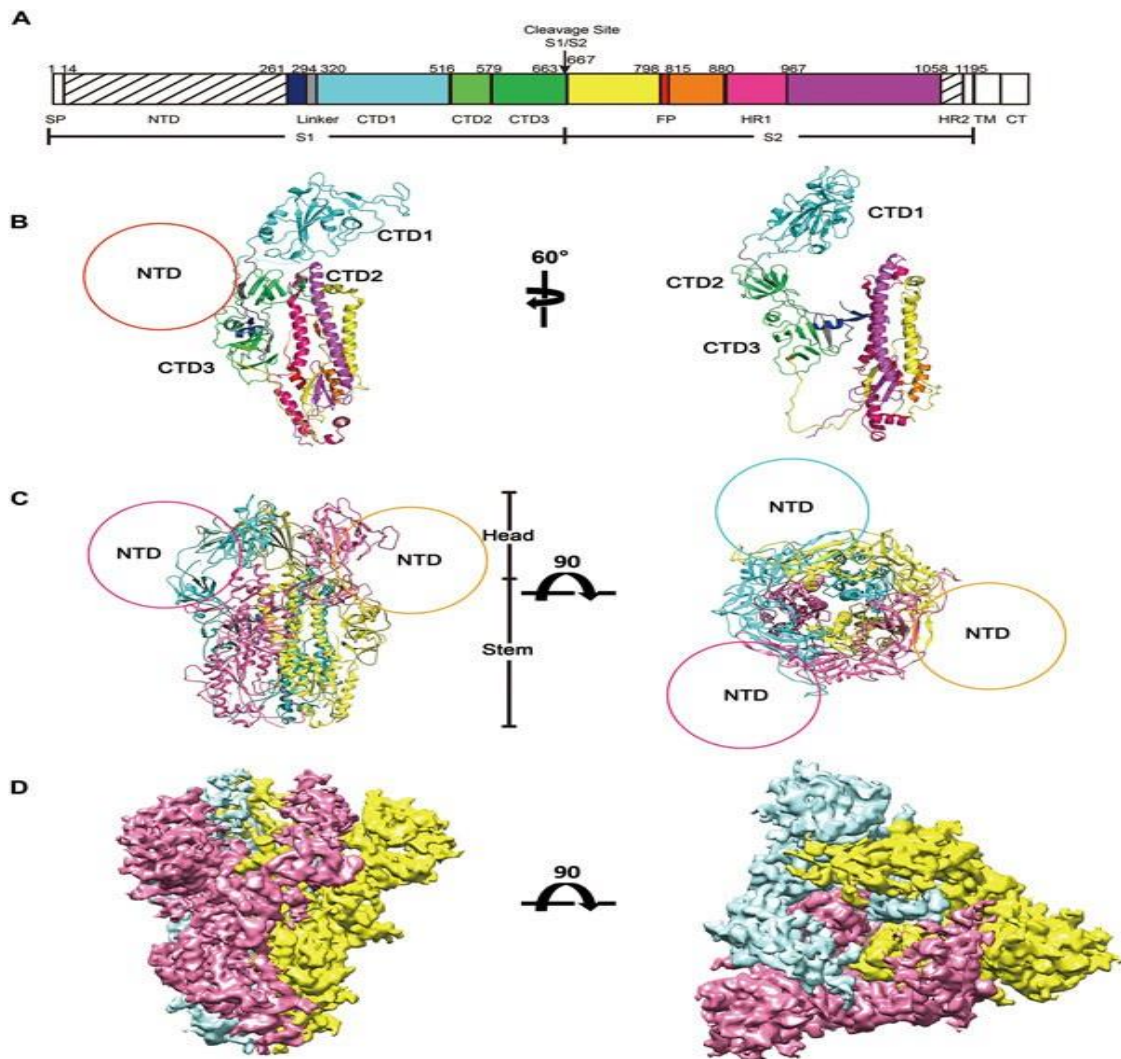


Εικόνα 2: Δομή SARS-CoV-2

Η γλυκοπρωτεΐνη S του SARS-CoV-2 αποτελείται από δύο υπομονάδες, S1 και S2, και συνήθως αναφέρεται ως «ακίδα». Η δομή αυτής της πρωτεΐνης μπορεί να παρατηρηθεί μέσω κρυσταλλογραφίας. Το μοντέλο Protein Data Bank (PDB) αυτής της γλυκοπρωτεΐνης αποκαλύπτει ότι οι υπομονάδες αποτελούνται από διαφορετικές περιοχές που είναι θεμελιώδεις για τη διαδικασία επιμόλυνσης και συνδέονται μεταξύ τους με μια γέφυρα πολυβασικών αμινοξέων, η οποία είναι απαραίτητη για τη στόχευση των ιών<sup>38</sup>. Ο ιός συνδέεται με το κύτταρο ξενιστή με τη βοήθεια της S-πρωτεΐνης και διεισδύει στο κύτταρο. Μετά τη διείσδυση, ξεκινά η διαδικασία μεταγραφής και ο πολλαπλασιασμός του ιού έως ότου το κύτταρο-ξενιστής μολυνθεί πλήρως και καταστραφεί<sup>39</sup>. Η πρωτεΐνη ακίδα SARS-CoV-2 είναι μια τριμερής γλυκοπρωτεΐνη 1.273 αμινοξέων και ευθύνεται για την είσοδο του ιού στα κύτταρα του ξενιστή. Κάθε μονομερές ακίδας έχει εκτεθειμένη σε μεγάλο βαθμό μια S1 επικράτεια πρόσδεσης (υπολείμματα 1–686) και μια μερικώς «θαμμένη» περιοχή σύντηξης S2 (υπολείμματα 687–1,273)<sup>40,41</sup>. Μέρος της S1, γνωστό ως περιοχή σύνδεσης υποδοχέα (Receptor Binding Domain, **RBD**, υπολείμματα 306–534), εναλλάσσεται μεταξύ ανοιχτής – κλειστής δομής ανάλογα με τη θέση του μέσα στην

πρωτεΐνη. Όταν βρίσκεται στην ανοικτή θέση, προσδένεται στον ανθρώπινο υποδοχέα του ενζύμου μετατροπής της αγγειοτενσίνης 2 (ACE2) που είναι και το απαραίτητο πρώτο βήμα για την είσοδο στον οργανισμό<sup>42-45</sup>. Περίπου 20 υπολείμματα RBD έρχονται σε επαφή με τον ανθρώπινο υποδοχέα ACE2. Το μέρος του RBD που περιέχει αυτά τα υπολείμματα ονομάζεται μοτίβο δέσμευσης υποδοχέα (Receptor Binding Motif, **RBM**), ενώ το υπόλοιπο αποτελεί τον πυρήνα του RBD. Παρόμοια με το RBD, μεγάλο μέρος της αμινοτελικής επικράτειας (amino-terminal Domain, NTD) εκτίθεται επίσης στην επιφάνεια του τριμερούς S. Το υπόλοιπο του μορίου S1 περιέχει δύο υποομάδες κάτω από το RBD που συνήθως αναφέρονται ως υποομάδα 1 (subdomain 1, SD1) και τον υποομάδα 2 (subdomain 2, SD2) και συγκροτούν τον S1 καρβοξυτελικό τομέα (S1 carboxy-terminal domain, CTD)<sup>46</sup>.

Το γονιδίωμα του νέου κορωνοϊού αναλύθηκε από επιστήμονες στην Κίνα και δημοσιεύθηκε στις 3 Φεβρουαρίου 2020 ενώ λίγες μέρες αργότερα μια ομάδα επιστημόνων στο Πανεπιστήμιο του Texas και στο Κέντρο Ερευνών Εμβολίων NIAID στις Ηνωμένες Πολιτείες απομόνωσαν ένα κομμάτι του γονιδιώματος που φαίνεται να κωδικοποιεί την γλυκοπρωτεΐνη S του SARS-CoV-2, συγκριτικά με αλληλουχίες άλλων γνωστών κορωνοϊών με παρόμοιο γονιδίωμα (όπως ο ιός SARS-CoV που εμφανίζει 80% ομοιότητα με τον SARS-CoV-2)<sup>27,28</sup>. Στη συνέχεια, η ομάδα χρησιμοποίησε καλλιεργημένα κύτταρα για να παράγει μεγαλύτερες ποσότητες γλυκοπρωτεΐνης S για περαιτέρω ανάλυση. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν κρυσταλλογραφία μικροσκοπία για να λάβουν λεπτομερείς εικόνες της δομής της γλυκοπρωτεΐνης S με ευκρίνεια 3.5 Å. Η τεχνική της κρυσταλλογραφίας μικροσκοπίας περιλαμβάνει το πάγωμα τμήματος του ιού σε υγρό άζωτο και την εκτόξευση μίας δέσμης ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας μέσα από το δείγμα για τη δημιουργία δεκάδων χιλιάδων εικόνων. Οι εικόνες αυτές συνδυάζονται στη συνέχεια και δίνουν μια λεπτομερή τρισδιάστατη απεικόνιση του ιού (Εικ.2).

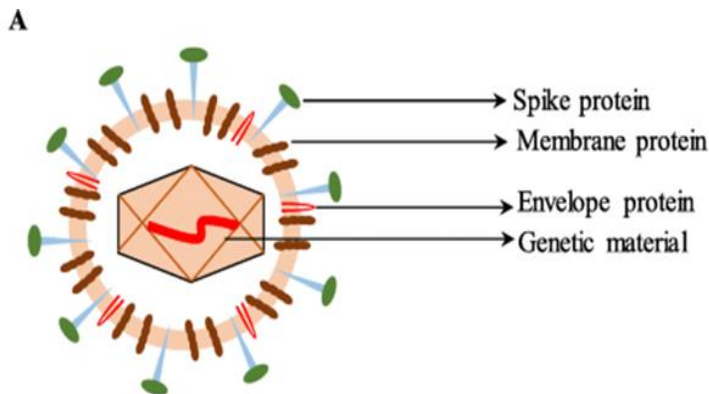


Εικόνα 3: Η δομή της γλυκοπρωτεΐνης S του SARS-CoV-2 μέσω κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας

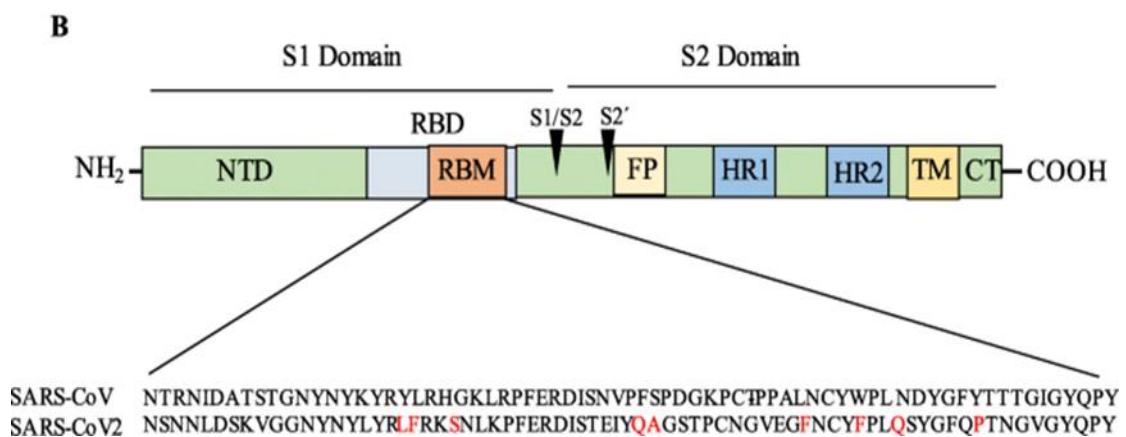
Η ίδια ερευνητική ομάδα εφάρμοσε την τεχνική της φασματοσκοπίας επιφανειακού συντονισμού πλασμονίων και μέτρησε ότι η γλυκοπρωτεΐνη S του SARS-CoV-2 προσδέεται 10 έως 20 φορές πιο ισχυρά με τον υποδοχέα ACE2 των ανθρώπινων κύτταρων σε σχέση με τη γλυκοπρωτεΐνη S του ιού SARS-CoV του 2002. Η ιδιότητα αυτή δίνει τη δυνατότητα στον SARS-CoV-2 να εξαπλώνεται ευκολότερα από άτομο σε άτομο σε σύγκριση με τους υπόλοιπους κορωνοϊούς<sup>28</sup>.

Ο ιός μεταλλάσσεται συνεχώς και ήδη υπάρχουν 61 διαφορετικές διαθέσιμες ακολουθίες της γλυκοπρωτεΐνης S στη βάση δεδομένων “Global Initiative on Sharing All Influenza Data, GISAID”<sup>29</sup>.

Διαπιστώθηκε ότι υπήρχαν μόλις εννέα υποκαταστάσεις αμινοξέων μεταξύ όλων των κατατεθειμένων ακολουθιών της γλυκοπρωτεΐνης S και οι περισσότερες από αυτές επηρεάζουν ουσιαστικά τη δομή ή τη λειτουργία της γλυκοπρωτεΐνης S<sup>28</sup>. Οι ίδιοι ερευνητές παρατήρησαν ότι η εν λόγω γλυκοπρωτεΐνη S παρουσιάζει 98% ομοιότητα με την αλληλουχία της γλυκοπρωτεΐνης S του κορωνοϊού RaTG13 που εμφανίζεται στις νυχτερίδες, και αυτό ενδεχομένως αποτελεί ένδειξη ότι ο ιός προήλθε από νυχτερίδα. Στις 19 Φεβρουαρίου 2020, μία ερευνητική ομάδα από την Κίνα ανέλυσε τη δομή της γλυκοπρωτεΐνης S του SARS-CoV-2 καταλήγοντας σε παρόμοια συμπεράσματα<sup>30,31</sup>.



Εικόνα 4: A) Πρωτεΐνη ακίδα του κορωνοϊού



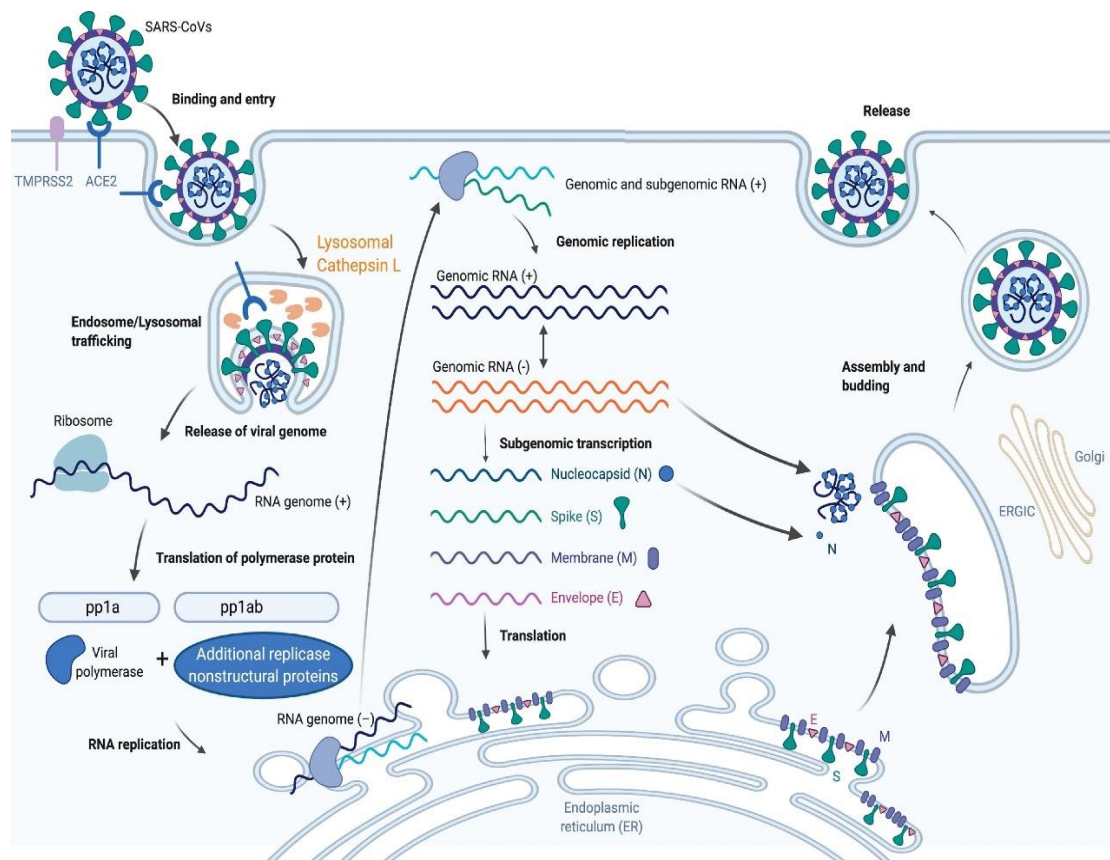
Εικόνα 4: B) σχηματικό διάγραμμα της δομής του κορωνοϊού

Η πρωτεΐνη ακίδα έχει επίσης 22 θέσεις γλυκοζυλίωσης, οι οποίες είναι κατανομημένες μεταξύ των υποομάδων S1 και S2. Εντός του S1, οκτώ από τις θέσεις αυτές βρίσκονται στην αμινοτελική περιοχή (NTD), δύο στον πυρήνα του RBD, τρεις στο καρβοξυτελικό τομέα (CTD) ενώ εννέα απαντώνται στο S2. Το S1 εμφανίζει μεγαλύτερη μεταβλητότητα στα αμινοξέα από το S2 μεταξύ των κορωνοϊών που σχετίζονται με το SARS. Μέσα στο S1, το RBD και το NTD είναι πιο μεταβλητά από το CTD. Εντός του RBD, το RBM είναι η πιο μεταβλητή περιοχή. Από τον Ιούνιο του 2021, 42 μεταλλάξεις ακίδας έχουν επιφέρει επιπολασμό σε δείγματα  $\geq 1,0\%$  συμπεριλαμβανομένων δεκαπέντε στο NTD, έξι στο RBD, πέντε στο CTD και εννιά στο S2. Οι περισσότερες από τις 32 μεταλλάξεις στην S1 με επιπολασμό  $\geq 1,0\%$  προέκυψαν σε πολλαπλές σειρές του SARS-CoV-2.

**Η ακίδα RBD συνιστά τον κύριο στόχο εξουδετέρωσης αντισώματων<sup>47-52</sup>.** Η παρουσία εξουδετερωτικών μονοκλωνικών αντισωμάτων (mAbs) που στοχεύουν το RBD συσχετίζονται με την προστασία σε ζωικά μοντέλα και σε εμβολιασμένα ή νοσούντα στο παρελθόν άτομα. Αυτά αν και έχουν κυτταρική ανοσία, τα δυνητικώς εναπομείναντα εξουδετερωτικά αντισώματα είναι πιθανό να συντελούν στην προστασία τους<sup>53-59</sup>. Η ανάπτυξη εξουδετερωτικών αντισωμάτων στην αρχική πορεία της λοίμωξης έχει συσχετιστεί με χαμηλότερα επίπεδα ιού και μεγαλύτερη προστασία από σοβαρές μολύνσεις<sup>58,60-63</sup>. Τέλος, η έγκαιρη χορήγηση των mAbs αντισωμάτων μειώνει τη σοβαρότητα της μόλυνσης<sup>62,64-66</sup>.

Ο κύκλος ζωής του κορωνοϊού που σχετίζεται με το SARS (SARS-CoV και SARS-CoV-2) αρχίζει με τη δέσμευση της πρωτεΐνης Spike στον συγγενή της υποδοχέα του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης 2 (ACE2). Η αποτελεσματική είσοδος στο κύτταρο ξενιστή στη συνέχεια εξαρτάται από: (i) τη διάσπαση της θέσης S1 / S2 από μια επιφανειακή πρωτεΐνη, τη διαμεμβρανική πρωτεάση της σερίνης 2 (TMPRSS2) ή (ii) την ενδολυσοσωμική καθεψίνη L, η οποία μεσολαβεί στη σύντηξη ιού με την κυτταρική μεμβράνη στην επιφάνεια του κυττάρου και στα ενδοσωματικά διαμερίσματα αντίστοιχα. Μέσω ενός εκ των δυο μηχανισμών εισόδου, το RNA του ιού απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή, όπου μεταφράζεται σε πρωτεΐνες

ρεπλικάσης (ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 1a / b: ORF1a / b). Οι πολυπρωτεΐνες (pp1a και pp1b) διασπώνται από μια κωδικοποιημένη από τον ιό πρωτεάση σε μεμονωμένες μη δομικές πρωτεΐνες του συμπλόκου ρεπλικάσης nsps και σε RNA πολυμεράση, την RdRp. Η αναπαραγωγή (αντιγραφή) ξεκινά σε διπλά μεμβρανικά κυστίδια (double-membrane vesicles, DMVs) του ενδοπλασματικού δικτύου (ER), τα οποία τελικά ενώνονται για να σχηματίσουν δομές περιελιγμένων μεμβρανών. Το γονιδίωμα θετικού κλώνου που εισέρχεται στα κυστίδια χρησιμοποιείται ως καλούπι για τη σύνθεση RNA αρνητικού κλώνου πλήρους μήκους και υπογονιδιωματικού RNA (subgenomic RNA, sgRNA). Η μετάφραση του sgRNA έχει ως αποτέλεσμα τόσο οι δομικές όσο και οι βοηθητικές πρωτεΐνες (N, S, M και E) να εισάγονται στο ενδιάμεσο διαμέρισμα ER – Golgi (ER–Golgi intermediate compartment, ERGIC) για τη συγκρότηση των ισωμάτων. Τέλος, τα επόμενα γονιδιώματα RNA θετικού κλώνου ενσωματώνονται στα νεοσυντιθέμενα ισωμάτια, τα οποία εκκρίνονται από την πλασματική μεμβράνη.



Εικόνα 5: Ο κύκλος ζωής του Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)



### *ΙΚά στελέχη, μεταλλάξεις & διασπορά*

Ο ικός πολλαπλασιασμός συχνά οδηγεί σε μεταλλάξεις<sup>67</sup>. Οι RNA ιοί, γνωστοί και ως ρετροϊοί, μεταλλάσσονται συνήθως περισσότερο από τους DNA ιούς. Ωστόσο οι κορονοϊοί, αν και κατάσσονται στους RNA ιούς, μεταλλάσσονται με μικρότερη συχνότητα από τους περισσότερους ιούς αυτού του είδους καθώς διαθέτουν ειδικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης του γενετικού τους υλικού. Οι μεταλλάξεις που προσδίδουν πλεονέκτημα στον πολλαπλασιασμό, τη μετάδοση ή την ανθεκτικότητα του ιού στην ανοσιακή απόκριση του ξενιστή είθισται να επικρατούν, ενώ εκείνες που προσδίδουν μειονέκτημα τείνουν να εξαλείφονται από τον πληθυσμό των ικών στελεχών. Στην πραγματικότητα πρόκειται για μια διαδικασία «φυσικής επιλογής» κατά την οποία τα νέα μεταλλαγμένα και πιο ανθεκτικά στελέχη κυριαρχούν. Τα στελέχη που εμφανίζονται κάθε φορά μπορεί να οφείλονται σε τυχαία συμβάντα. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της φυσικής επιλογής και τυχαίων γεγονότων καθορίζει την εξέλιξη του ιού εντός του ξενιστή στην κοινότητα και σε πιο εκτεταμένες γεωγραφικές περιοχές.

Αν και οι όροι μετάλλαξη, παραλλαγή και στέλεχος χρησιμοποιούνται συχνά εναλλακτικά για την περιγραφή της επιδημιολογίας του SARS-CoV-2, οι διαφορές είναι σημαντικές. Η **μετάλλαξη** αναφέρεται σε μια αντικατάσταση στο γενετικό υλικό ή την πρωτεΐνη του ιού: για παράδειγμα η D614G αποτελεί μια αντικατάσταση στη θέση 614 της εξωτερικής γλυκοπρωτεΐνης. Τα ικά γονιδιώματα που έχουν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη χαρακτηρίζονται ως **παραλλαγές**. Αυτός ο όρος είναι όμως λιγότερο ακριβής επειδή δυο παραλλαγές μπορεί να διαφέρουν κατά μία ή περισσότερες μεταλλάξεις. Συνήθως αναφερόμαστε σε μια παραλλαγή όταν ένα στέλεχος παρουσιάζει διαφορετικό φαινότυπο όπως διαφορές στην αντιγονικότητα, τη μεταδοτικότητα ή τη λοιμοτοξικότητα.

### *Ιικά στελέχη, μεταλλάξεις & διασπορά*

Τον Φεβρουάριο 2020 καταγράφεται η πρώτη μετάλλαξη, η D614G<sup>68</sup> και αρχικά θεωρήθηκε ότι πρόκειται για μια ανεξάρτητη μετάλλαξη που εμφανίστηκε σε κάποιες περιοχές του πλανήτη. Όμως στελέχη του ιού με τη D614G εντοπίστηκαν σε αρκετές περιοχές της Κίνας ήδη από τον Ιανουάριο του 2020. Ενδέχεται λοιπόν η παγκόσμια διασπορά της D614G να οφείλεται στις πρώτες τυχαίες μεταλλάξεις κατά τις οποίες ο αρχικός ιός που μεταδόθηκε σταδιακά σε όλο τον κόσμο, έφερε ήδη τη συγκεκριμένη μετάλλαξη. Αυτή η εύλογη υπόθεση οδήγησε πολλούς στη σκέψη ότι η D614G παρείχε στον ιό κάποιο εξελικτικό πλεονέκτημα.

Στις μέρες μας παρατηρούνται ολοένα και πιο συχνά παραλλαγές ειδικού ενδιαφέροντος του SARS-CoV-2 (Variants of Concern – VOC, Variants of Interest – VOI) που μοιράζονται διαφορετικές μεταλλάξεις και επιτρέπουν στον ιό να ξεφεύγει από τη σταδιακά αυξανόμενη πληθυσμιακή ανοσία, διατηρώντας ή αυξάνοντας την ικανότητα αναπαραγωγής του. Αυτές οι μεταλλάξεις ανήκουν σε ένα μοτίβο επαναλαμβανόμενων μεταλλάξεων, οι περισσότερες εκ των οποίων εντοπίζονται στο γονίδιο της πρωτεΐνης ακίδας. Από τα πρώιμα στάδια της πανδημίας, οι μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη ακίδα θεωρούνται βιολογικά και κλινικά οι πλέον σημαντικές και επηρεάζουν τον επιπολασμό. Για να κατανοήσουμε τις βιολογικές ιδιότητες και τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά των παραλλαγών, είναι απαραίτητο να διευκρινιστούν οι μεταλλάξεις των συστατικών τους. Οι μεταλλάξεις αυτές χωρίζονται σε επτά κατηγορίες:

1. *τη μετάλλαξη D614G στο RBD*
2. *τη μετάλλαξη N501Y στο RBD*
3. *τη μετάλλαξη E484K στο RBD*
4. *άλλες μεταλλάξεις στο RBD*
5. *μεταλλάξεις στο NTD*
6. *μεταλλάξεις κοντά στη θέση διάσπασης της φουρίνης S1/S2*
7. *non-spike μεταλλάξεις.*

## Κύριες μεταλλάξεις στο RBD

### **1. D614G**

Ο επιπολασμός της μετάλλαξης D614G άρχισε να αυξάνεται τέλη Φεβρουαρίου 2020 και μέσα σε λίγους μήνες ξεπέρασε όλους τους προγονικούς ιούς και ανέβηκε σε παγκόσμιο ποσοστό περίπου στο 100%.<sup>69</sup> Κλώνοι ιών μεταλλαγμένων με το D614G αναπαράγονται σε υψηλότερα επίπεδα στα κύτταρα των αεραγωγών ανθρώπου και στις ανώτερες αναπνευστικές οδούς ινικών χοιριδίων σχετιζόμενοι επίσης με αυξημένη μεταδοτικότητα του ιού.<sup>70-72</sup> Μελέτες κρουσηλεκτρονικής μικροσκοπίας έδειξαν ότι η D614G διαταράσσει έναν ή περισσότερους διαπρωτεϊνικούς συνδέσμους, και έτσι αυξάνεται η πιθανότητα ένα ή περισσότερα από τα τρία RBD να βρίσκονται σε ανοιχτή αντί για κλειστή θέση και ως εκ τούτου να είναι συμβατή η πρωτεΐνη ακίδα με τον υποδοχέα δέσμευσης ACE2<sup>73,74</sup>. Στη συνέχεια, πρόσθετες μεταλλάξεις στην ακίδα CTD και στο S2 έχουν επίσης θεωρηθεί ότι αυξάνουν την αναπαραγωγική ικανότητα του SARS-CoV-2 με παρόμοιο μηχανισμό<sup>75</sup>. Η D614G μπορεί να είναι υπεύθυνη και για την αύξηση του αριθμού των πρωτεϊνών ακίδας στην επιφάνεια του ιού<sup>76,77</sup> και του ρυθμού διάσπασης των S1/S2<sup>78</sup>. Άτομα που φέρουν τον μεταλλαγμένο ιό εμφανίστηκαν ελαφρώς πιο επιρρεπή στη νόσο ακόμα και αν είχαν ήδη νοσήσει ή εμβολιαστεί<sup>71,80</sup>.

### **2. N501Y**

Η N501Y παρατηρείται στις παραλλαγές Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351) και Gamma (P.1). Έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τη συγγένεια της πρωτεΐνης ακίδας για τον υποδοχέα ACE2 και ευνοεί την αντιγραφή του ιού σε ανθρώπινα κύτταρα των ανώτερων αεραγωγών<sup>81,82</sup>. Ωστόσο δεν φαίνεται να επηρεάζει τη δέσμευση και την εξουδετέρωση των περισσότερων μονοκλωνικών αντισωμάτων (mAbs)<sup>83,84</sup>. Από μόνο της επίσης, σπάνια επιφέρει μείωση στην ευαισθησία πλάσματος ατόμων που χορηγήθηκε ένα από τα τα δύο εγκεκριμένα mRNA εμβόλια (Pfizer/BioNTech BNT162b2 ή Moderna mRNA-1273) ή το εμβόλιο Novavax της πρωτεϊνικής υπομονάδας NVX-CoV2373<sup>83-88</sup>.

### **3. E484K/E484Q**

Η E484K αναγνωρίζεται από το υψηλό ποσοστό πολυκλωνικών αντισωμάτων που αναπτύσσονται σε άτομα που έχουν μολυνθεί με SARS-CoV-2. Παρατηρείται στις παραλλαγές Beta και Gamma<sup>89,90</sup>, Eta (B.1.525), Iota (B.1.526)<sup>91</sup>, Theta (P.3)<sup>92,93</sup>, Zeta (P.2)<sup>94</sup>, Kappa (B.1.617.1) και λιγότερο συχνά στην Alpha<sup>95,96</sup>. Η E484Q εντοπίζεται στην παραλλαγή Kappa. Η E484K μειώνει την ευαισθησία στα mAbs κι έτσι έχει ως αποτέλεσμα μείωση της ευαισθησίας στα αντισώματα 3 έως και 10 φορές στο 30% και περισσότερο από 10 φορές στο 10% περίπου των δειγμάτων πλάσματος ασθενών που αναρρώνουν<sup>97-103</sup>. Η E484K οδήγησε επίσης σε τριπλάσια έως και δεκαπλάσια μείωση της ευαισθησίας στο 30% περίπου των δειγμάτων πλάσματος από άτομα που έχουν ανοσοποιηθεί με ένα από τα εγκεκριμένα εμβόλια mRNA<sup>102,104-106</sup>.

### **4. Άλλες μεταλλάξεις στο RBD**

Η **L452R** υπάρχει στην παραλλαγή Delta (B.1617.2), Kappa και Epsilon (B.1.427/9)<sup>106</sup>. Μειώνει την ευαισθησία σε πολλά mAb κατηγορίας 2 RBM, συμπεριλαμβανομένων του bamlanivimab, αλλά όχι στα άλλα εγκεκριμένα από τον FDA mAbs<sup>99,100,107</sup>. Το L452R είχε ως αποτέλεσμα 3 έως 10 φορές μειωμένη ευαισθησία στο ένα τρίτο περίπου στα δείγματα του πλάσματος των ανοσοποιημένων ατόμων<sup>120-122</sup>. Ιοί ψευδοτύπου που περιέχουν L452R συσχετίστηκαν με υψηλότερα επίπεδα κυτταρικής εισόδου στον πνεύμονα σε σύγκριση με τους ιούς που φέρουν τη μετάλλαξη D614G μόνο αλλά χαμηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με ψευδοτυπικούς ιούς που περιέχουν N501Y<sup>106</sup>.

Οι μεταλλάξεις **K417N/T** απαντώνται στις παραλλαγές Beta (ως K417N) και Gamma (ως K417T). Το K417 N/T σπάνια εμφανίζεται εν απουσία άλλων μεταλλάξεων στο RBM, πιθανώς επειδή οι μεταλλάξεις K417 φαίνεται να μειώνουν τη δέσμευση στον υποδοχέα ACE2<sup>105,110</sup>. Προσδίδει μείωση της ευαισθησίας περισσότερο από 100 φορές στο etesevimab και περίπου 10 φορές στο casirivimab αλλά δεν την επηρεάζει στα bamlanivimab, imdevimab και sotrovimab<sup>102</sup>. Οι K417 N/T διατηρούν πλήρη ευαισθησία σε δείγματα πλάσματος από ανοσοποιημένα άτομα<sup>101,102</sup>.

Η μετάλλαξη **N439K** αυξάνει τη συγγένεια ως προς τον υποδοχέα ACE2 και μειώνει την ευαισθησία στο imdevimab<sup>103,104</sup>. Ιοί που φέρουν τη μετάλλαξη N439K συνήθως διατηρούν πλήρη ευαισθησία στο πλάσμα των ασθενών που νόσησαν. Αυξήσεις στον επιπολασμό δύο σειρών που περιέχουν N439K αναφέρθηκαν στο Ηνωμένο Βασίλειο τον Σεπτέμβριο του 2020<sup>113</sup>.

Η μετάλλαξη **Y453F** εμφανίστηκε ανεξάρτητη αρκετές φορές σε διάφορους ζωικούς οργανισμούς συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου αλλά δεν είναι πλέον ενεργή<sup>114</sup>. Η Y453F αυξάνει τη δέσμευση στον ACE2, ωστόσο παραμένει σπάνια μετάλλαξη<sup>103</sup>. Μειώνει σημαντικά την ευαισθησία στο casirivimab αλλά όχι στα άλλα εγκεκριμένα μονοκλωνικά αντισώματα από τον FDA<sup>97,111</sup>.

Η μετάλλαξη **S477N** ήταν παρούσα σε μια παραλλαγή που εξαπλώθηκε ευρέως στην Ευρώπη το καλοκαίρι του 2020<sup>123</sup>. Αυξάνει την ισχύ δέσμευσης στον ACE2 αλλά έκτοτε κυκλοφορεί σε πιο χαμηλά επίπεδα<sup>103</sup>. Δεν έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την ευαισθησία σε οποιοδήποτε από τα εγκεκριμένα mAbs από τον FDA EUA<sup>99,111</sup>.

Η μετάλλαξη **T478K** παρατηρείται στην παραλλαγή Delta και σε μια κοινή παραλλαγή στο Μεξικό<sup>115</sup>. Από μόνη της, διατηρεί την ευαισθησία σε όλα εκτός από μερικά mAb και στα περισσότερα πλάσματα αναρρωμένων και εμβολιασμένων ατόμων<sup>104,105,116</sup>

Οι **F490S** και **S494P** είναι ασυνήθιστες ανεξάρτητες μεταλλάξεις του RBM έχουν προκύψει σε διάφορες παραλλαγές Alpha<sup>117</sup>. Το F490S σχετίζεται με εξαιρετικά μειωμένη ευαισθησία στο bamlanivimab αλλά διατηρεί την ευαισθησία στα άλλα εγκεκριμένα mAbs από τον FDA<sup>118,119</sup>. Το S494P σχετίζεται με >10 φορές μειωμένη ευαισθησία στο bamlanivimab και περίπου 5 φορές μειωμένη ευαισθησία στο casirivimab<sup>99,119</sup>.

### **Μεταλλάξεις εκτός του RBD**

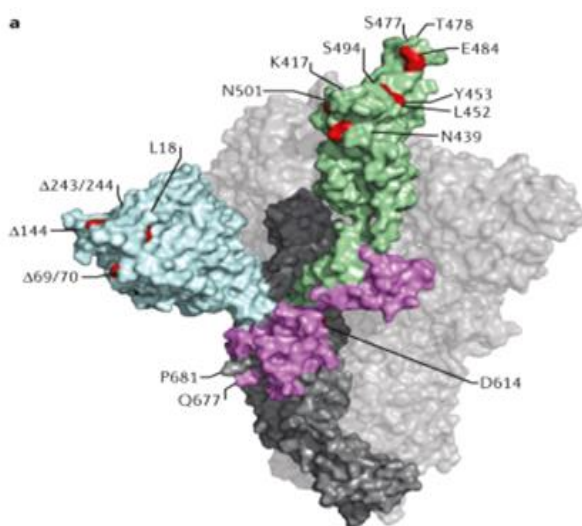
#### **5. Μεταλλάξεις NTD**

Απαλοιφές σε τμήματα του NTD παρατηρούνται σε πολλές παραλλαγές

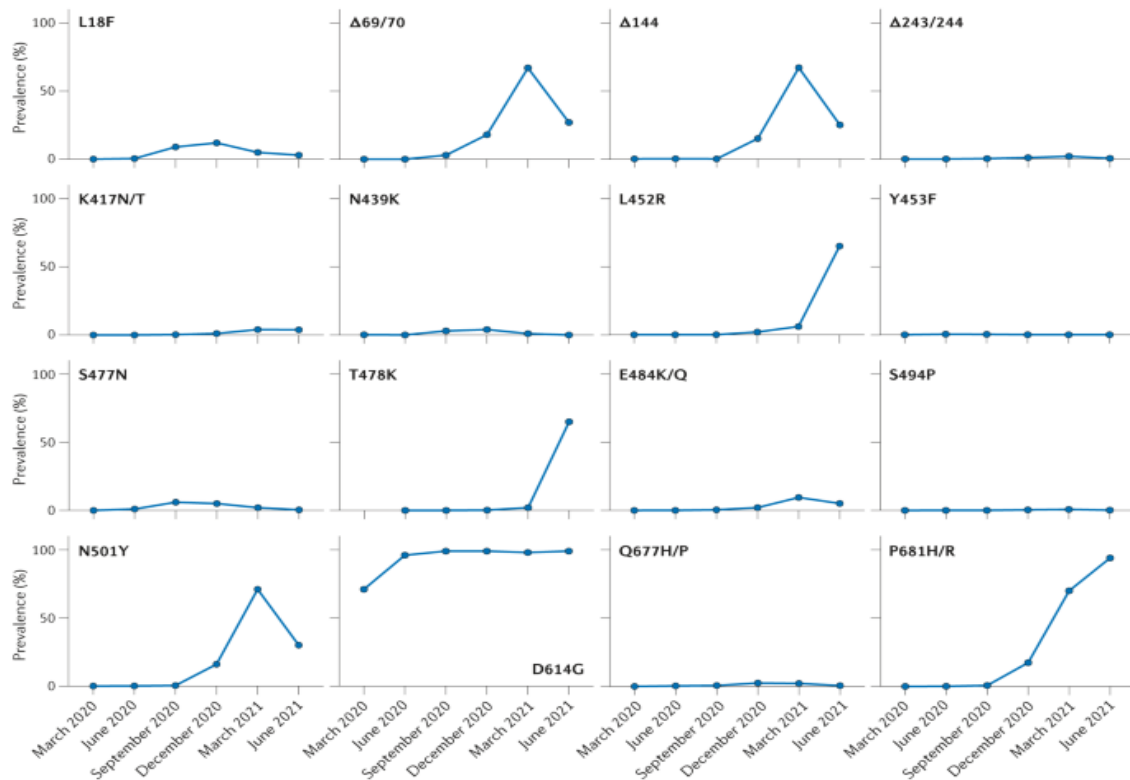
ειδικού ενδιαφέροντος, και έχουν επίσης συνδεθεί με παρατεταμένες λοιμώξεις απόμων με SARS-CoV-2<sup>114-116</sup>. Απαλοιφές στις θέσεις 69–70 φαίνεται να σχετίζονται κυρίως με την αυξημένη αντιγραφή του ιού<sup>125,128</sup> ενώ ο ίδιος τύπος μετάλλαξης στις θέσεις 141-146 και 242-244 επιφέρει αλλαγές στην εξουδετερωτική δραστηριότητα των αντισωμάτων που δεσμεύονται στην επικράτεια NTD<sup>102,129,130</sup>. Άλλες μεταλλάξεις στις NTD συμπεριλαμβανομένων των **L18F** και **D253Y** οδηγούν σε μείωση της ευαισθησίας στα αντισώματα εξουδετέρωσης της NTD<sup>117,131</sup>.

### 6. Μεταλλάξεις κοντά στη θέση διάσπασης της φουρίνης S1/S2

Μεταλλάξεις ανοδικά της περιοχής διάσπασης της πολυβασικής φουρίνης S1/S2 — συμπεριλαμβανομένων των **Q675H/R**, **Q677H/P**, **N679K** και **P681H/R** — έχουν εμφανιστεί ανεξάρτητα σε πολλές παραλλαγές του SARS-CoV-2<sup>132</sup>. Η P681H υπάρχει στην παραλλαγή Alpha και τη Theta, και σε αρκετές επιπλέον σειρές του SARS-CoV-2<sup>133</sup>. Η P681R απαντάται στις παραλλαγές Delta και Kappa. Παρατηρείται αυξημένο θετικό φορτίο που σχετίζεται τόσο με την P681H όσο και με την P681R και φαίνεται να επηρεάζει τον τροπισμό του ιού αυξάνοντας τη διάσπαση της S1/S2 στα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών.<sup>134-136</sup>



Εικόνα 6α: Εντοπισμός βασικών μεταλλάξεων ακίδων SARS-CoV-2



Εικόνα 6β: Επιπολασμός βασικών μεταλλάξεων ακίδων SARS-CoV-2.

## 7. Non spike μεταλλάξεις

Ορισμένες μεταλλάξεις εκτός της πρωτεΐνης ακίδας θεωρούνται ότι αυξάνουν τη μεταδοτικότητα του SARS-CoV-2 ανταγωνίζοντας την απόκριση του ξενιστή στις ιντερφερόνες τύπου I. Σε μια μελέτη, οι παραλλαγές του ιού Alpha και Beta εμφάνισαν κατά μέσο όρο 112 φορές και 8 φορές αντίστοιχα μειωμένη ευαισθησία σε αρκετές ιντερφερόνες τύπου I σε σύγκριση με τον αρχική μορφή του<sup>137</sup>. Σε δεύτερη μελέτη, βρέθηκε ότι η παραλλαγή Alpha μειώνει τα επίπεδα έκφρασης της ιντερφερόνης-β (IFNβ) και είναι λιγότερο ευαίσθητη στην αγωγή με IFNβ σε σύγκριση με τα αρχικά στελέχη κατά την έναρξη της πανδημίας<sup>138</sup>. Στην ίδια και σε μια τρίτη μελέτη, η μετάλλαξη D3L, που εντοπίζεται στο νουκλεοκαψίδιο της παραλλαγής Alpha, αποδείχθηκε ότι εισάγει (enhanced) μια ρυθμιστική αλληλουχία μεταγραφής (TRS) ανοδικά του Orf9b, ενός γονιδίου - ανταγωνιστή της ιντερφερόνης που εκφράζεται ως ένα εναλλακτικό πλαίσιο ανάγνωσης εντός της κωδικοποιητικής περιοχής του νουκλεοκαψιδίου<sup>138-140</sup>.

Αν και η μετάλλαξη D3L του νουκλεοκαψιδίου δεν εντοπίζεται σε άλλες παραλλαγές VOC ή VOI, οι περισσότερες από αυτές τις παραλλαγές φέρουν μεταλλάξεις σε γονίδια που σχετίζονται με τον ανταγωνιστή της ιντερφερόνης. Ένα παράδειγμα είναι μια επαναλαμβανόμενη έλλειψη (Δ106–108) μιας άγνωστης φαινοτυπικής ακολουθίας στο nsr6, ένα συστατικό του συμπλέγματος δέσμευσης του SARS-CoV-2 με τη μεμβράνη, που επίσης ανταγωνίζεται την ιντερφερόνη<sup>141</sup> και εμφανίζεται στις παραλλαγές Alpha, Beta, Gamma (VOCs) και Eta, Iota, Lambda (VOIs). Ένα άλλο παράδειγμα είναι ένα επαναλαμβανόμενο μοτίβο αλλαγής τριών νουκλεοτιδίων στο γονίδιο του νουκλεοκαψιδίου που πιθανώς προέκυψε από τον ομόλογο ανασυνδυασμό του γονιδίου-οδηγού TRS στον πυρήνα και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή δύο αμινοξέων, των R203K/G204R και την εμφάνιση νέων υπογονιδιωματικών μεταγράφων άγνωστων συνεπειών<sup>142,143</sup>.



### *Ιικά στελέχη, μεταλλάξεις, & διασπορά*

Οι νέες παραλλαγές εξαπλώνονται επειδή διαθέτουν κάποια ανταγωνιστικά πλεονεκτήματα έναντι των αρχικών στελεχών. Τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά είναι η υψηλή μολυσματικότητα λόγω αύξησης του ιικού φορτίου στον βλεννογόνο του αναπνευστικού, η μεγάλη διάρκεια μόλυνσης και η συγγένεια του ιού με τους κυτταρικούς υποδοχείς στα κύτταρα του βλεννογόνου. Ένα άλλο σύνηθες χαρακτηριστικό που διευκολύνει την ταχεία μετάδοση μιας παραλλαγής είναι η απώλεια της λοιμογόνου δράσης της, γεγονός που καθιστά τις λοιμώξεις πιο ήπιες και ασυμπτωματικές με αποτέλεσμα να ανιχνεύεται πιο δύσκολα και να εξαπλώνεται με ταχείς ρυθμούς. Για παράδειγμα η εντονότερη μολυσματικότητα της βρετανικής παραλλαγής (B.1.1.7) ενδεχομένως κάνει δύσκολη την παγκόσμια εξάπλωση άλλων λιγότερο μεταδοτικών αλλά πιο σοβαρών στελεχών, όπως το νοτιοαφρικανικό Beta (B.1.351). Έτσι, η μεγάλη μεταδοτικότητα του βρετανικού στελέχους παρόλο που θεωρητικά δεν είναι τόσο απειλητική όσο άλλα στελέχη, οδηγεί στην ραγδαία αύξηση του συνολικού αριθμού των κρουσμάτων συμπεριλαμβανομένων και σοβαρών περιστατικών που οδηγούν σε νοσηλεία ή και θάνατο.

Επιπλέον η κακή ανοσολογική απόκριση σε φυσική ή τεχνητή επιμόλυνση διευκολύνει την επικράτηση επικίνδυνων παραλλαγών. Πράγματι, η υψηλή ικανότητα αναπαραγωγής των ιών που ευθύνεται για την αύξηση του ιικού φορτίου και της μολυσματικότητάς τους σε συνδυασμό με την εξουδετέρωση της δράσης των αντισωμάτων, κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, συμβάλλουν σημαντικά στην επικράτηση και τη διασπορά των παραλλαγών<sup>144,145</sup>. Όλα αυτά συνιστούν ισχυρό επιχείρημα υπέρ του συλλογικού εμβολιασμού σε σύντομο χρονικό διάστημα, κατά προτίμηση με εμβόλια υψηλής αποτελεσματικότητας που χορηγούνται σε δυο δόσεις<sup>146</sup>. Αυτός είναι επίσης ο λόγος για τον οποίο η χρονική περίοδος μεταξύ των δόσεων δεν πρέπει να είναι υπερβολικά μεγάλη, καθώς η μερική ανοσία σε αυτή την περίοδο μπορεί να διευκολύνει την ανθεκτικότητα των στελεχών στα εμβόλια.

Μεταξύ των ανθρώπων ο SARS-CoV-2 μεταδίδεται κυρίως μέσω αναπνευστικών σταγονιδίων αλλά και αερολυμάτων, της άμεσης επαφής

με μολυσμένες επιφάνειες και της κοπρανοστοματικής οδού<sup>147-149</sup>. Κατά την έναρξη της πανδημίας η καταγραφή ολοένα και περισσότερων περιστατικών ασθενών με συμπτώματα λοίμωξης κατώτερου αναπνευστικού που ενίοτε κατέληγε σε σοβαρή πνευμονία, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ο SARS-CoV-2 μεταδίδεται μέσω της αναπνευστικής οδού. Η άποψη αυτή ενισχύεται ακόμα περισσότερο λόγω της ενεργής αντιγραφής του SARS-CoV-2 τόσο στην ανώτερες όσο και στις κατώτερες αεροφόρες οδούς (upper/lower respiratory tract, URT/LRT) και της αποδεδειγμένης εξάπλωσης του ιού κατόπιν στενών επαφών με άτομα που παρουσιάζουν βήχα<sup>150-152</sup>. Κατά την χρονική περίοδο διεξαγωγής αυτής της μελέτης, ο βασικός αριθμός αναπαραγωγής ( $R_0$ ) ήταν  $\sim 2,2$  με βάση την έγκαιρη παρακολούθηση των κρουσμάτων κατά την έναρξη της πανδημίας, με χρόνο επώασης περίπου πέντε ημέρες<sup>151,153</sup>.

Επιπλέον υπάρχουν στοιχεία για ασυμπτωματική ή προσυμπτωματική εξάπλωση του SARS-CoV-2, η οποία έρχεται σε αντίθεση με τη δυναμική μετάδοσης του SARS-CoV<sup>154</sup>. Αυτό το γεγονός δείχνει την ικανότητα του SARS-CoV-2 να αποικίζει και να αναπαράγεται στον λαιμό κατά τη διάρκεια της πρώιμης μόλυνσης<sup>155,156</sup>. Με βάση αυτές τις προφανείς διαφορές στη μετάδοση του ιού, μελετήθηκε η δυναμική μετάδοσης του SARS-CoV-2 μόνο σε προσυμπτωματικά άτομα και έδειξε ότι το προσυμπτωματικό  $R_0$  έχει από μόνο του πλησιάσει το όριο για τη διατήρηση της επιδημίας ( $R_0 > 1$ ). Αντίθετα οι αντίστοιχες εκτιμήσεις για τον SARS-CoV ήταν περίπου μηδενικές. Ομοίως, η ασυμπτωματική εξάπλωση του SARS-CoV-2 μελετήθηκε καθ' όλη τη διάρκεια της πανδημίας<sup>152,155,157-160</sup>. Η κατανόηση της σχετικής σημασίας της μη συμπτωματικής μετάδοσης, στην τρέχουσα πανδημία COVID-19 είναι απαραίτητη για τους φορείς της δημόσιας υγείας, ώστε να ληφθούν πιο στοχευμένα και αποτελεσματικά μέτρα για τον έλεγχο της νόσου τα οποία περιλαμβάνουν τη χρήση μάσκας, τον εντοπισμό των κρουσμάτων, των στενών επαφών τους και τη φυσική απομόνωση.

Έχουν προταθεί διάφοροι τρόποι μετάδοσης για τον SARS-CoV-2, συμπεριλαμβανομένου των αερολυμάτων, των μολυσματικών επιφανειών και της κοπρανοστοματικής οδού, η σχετική σημασία των οποίων εξακολουθεί να διερευνάται<sup>161</sup>. Δεν υπάρχουν μολυσματικά ισοβάτια

SARS-CoV-2 που να έχουν απομονωθεί, αν και το RNA του ιού ήταν ανιχνεύσιμο στον αέρα των νοσοκομείων που φιλοξένησαν ασθενείς με COVID-19<sup>162,163</sup>. Η εναπόθεση αερολυμάτων με ιούς μπορεί να προκαλέσει τη μόλυνση αντικειμένων και έτσι την αύξηση της μετάδοσης από άνθρωπο σε άνθρωπο<sup>163,165</sup>. Τέλος, η κοπρανοστοματική μετάδοση θεωρείται ως πιθανή οδός ανθρώπινης εξάπλωσης, αλλά παραμένει αίνιγμα παρά τις ενδείξεις αερολυμάτων φορτωμένων με RNA που βρέθηκαν κοντά σε τουαλέτες, μαζί με ανιχνεύσιμο RNA του SARS-CoV-2 στα λύματα από τις αρχές της πανδημίας του COVID-19 στην Κίνα<sup>163,166</sup>.

## Παραλλαγές SARS-CoV-2

Οι παραλλαγές SARS-CoV-2 ταξινομούνται σε γενεές και ανάλογα με τις μεταλλάξεις που φέρουν. Οι ιοί που ανήκουν στην ίδια γενεαλογία αλλά περιέχουν διαφορετικά υποσύνολα μεταλλάξεων μπορούν να ταξινομηθούν ως διαφορετικές παραλλαγές.

Μια γενεαλογία του SARS-CoV-2 χαρακτηρίζεται ως παραλλαγή όταν φέρει μεταλλάξεις στο γονιδίωμα που επιφέρουν τροποποιήσεις στον φαινότυπο, όπως διαφορετικά αντιγόνα, αλλαγές στη μεταδοτικότητα, την τοξικότητα ή την ικανότητα να ξεφεύγουν της χυμικής ανοσίας. Έχει αποδειχθεί ότι η αυξημένη μεταδοτικότητα πηγάζει από την ικανότητα μιας παραλλαγής να υπερτερεί έναντι άλλων και να παρουσιάζει πιο αποτελεσματικό ρυθμό αναπαραγωγής και υψηλότερο ποσοστό δευτερογενούς επιμόλυνσης<sup>167</sup>. Η τοξικότητα έχει αξιολογηθεί βάσει των στοιχείων θνησιμότητας και των ποσοστών νοσηλείας. Οι παραλλαγές που σχετίζονται με υψηλότερα επίπεδα ιικού φορτίου μπορεί να είναι πιο μεταδοτικές και να προκαλούν πιο σοβαρή νόσηση. Η ανθεκτικότητά τους στη χυμική ανοσία έχει αξιολογηθεί συγκρίνοντας την ευαισθησία της παραλλαγής στα υπάρχοντα στον νοσούντα mAbs, με τα mAbs στο πλάσμα ασθενών κατά το παρελθόν ή εμβολιασμένων ατόμων.

Οι κορονοϊοί κατατάσσονται στους RNA ιούς και ως εκ τούτου αναμενόταν να έχουν ιδιαίτερα υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων. Ωστόσο, αυτή η συχνότητα μειώνεται στον SARS-CoV-2 με την παρουσία ενός ενζύμου που διορθώνει σφάλματα κατά την αντιγραφή. Οι παραλλαγές που έχουν λάβει την μεγαλύτερη επιστημονική και κλινική προσοχή είναι αυτές που επιδρούν σε περιοχές της πρωτεΐνης ακίδας (spike protein), εκεί όπου συνδέονται οι ιοί με τους υποδοχείς ACE2 και τροποποιείται ο κλινικός τους αντίκτυπος, καθώς και η ικανότητά τους να αποικίζουν στην αναπνευστική οδό και να αυξάνουν τη διασπορά τους<sup>168,169</sup>.

Στις επόμενες ενότητες, συνοψίζονται τα βιολογικά, επιδημιολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά των κυριότερων παραλλαγών VOCs (Variants of Concern) και VOI (Variants of Interest) από τον Ιούνιο του 2021 μέχρι και σήμερα.

## *Είδη παραλλαγών SARS-COV-2*

Οι διάφορες παραλλαγές, ανάλογα τον κίνδυνο που δύνανται να προκαλέσουν, διαχωρίζονται σε τρεις κατηγορίες<sup>170</sup>:

- i. Παραλλαγές ενδιαφέροντος, Variants of interest (VOI): συνήθως ανιχνεύονται σποραδικά και σε ορισμένες χώρες. Μετά την αρχική τους περιγραφή έχουν συσχετιστεί με επακόλουθη αύξηση των κρουσμάτων. Πολλές από αυτές φέρουν μεταλλάξεις στους υποδοχείς σύνδεσης. Αυτές οι γενετικές αλλαγές καθιστούν τις παραλλαγές πιο μεταδοτικές και εν μέρει ικανές να διαφεύγουν της φυσικής ή της – επαγόμενης από τον εμβολιασμό – ανοσίας. Σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται οι παραλλαγές P.2 (που περιγράφονται στη Βραζιλία), B.1.526 (που σχετίζονται με ταχεία εξάπλωση στη Νέα Υόρκη), B.1.525 (γνωστό ως Νιγηριανή, που όμως πρωτοεμφανίστηκε στο Ηνωμένο Βασίλειο).
- ii. Παραλλαγές ανησυχίας - σημαντικές για τη δημόσια υγεία, Variants of concern or public health importance (VOC): είναι συνήθως πιο μεταδοτικές και γενικά πιο μολυσματικές από τις παραλλαγές ενδιαφέροντος καθώς μπορεί να προκαλέσουν πιο σοβαρή ασθένεια με αυξημένες νοσηλείες και υψηλότερη θνησιμότητα. Επίσης, ενδέχεται να μειώσουν την αποτελεσματικότητα των θεραπειών και να ξεφύγουν από την επίδραση του αντισωμάτων που αποκτήθηκαν μετά τη φυσική μόλυνση με προηγούμενες παραλλαγές ή με τον εμβολιασμό. Παγκοσμίως, τα περισσότερα περιστατικά λοιμώξεων που οφείλονται στις συγκεκριμένες παραλλαγές, είναι επαναλοιμώξεις. Αναφέρονται δηλαδή σε ασθενείς που έχουν ήδη νοσήσει με SARS-CoV-2. Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει τις παραλλαγές B.1.1.7 (UK), B.1.351 (Νοτιοαφρικανική) και P.1 (Βραζιλίας). Μοιράζονται από κοινού ορισμένες μεταλλάξεις στην αλληλουχία που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ακίδα, όπως η N501Y (στο Ηνωμένο Βασίλειο και τη Νότια Αφρική) και η E848K (στη Νότια Αφρική και τη Βραζιλία). Στην περίπτωση της παραλλαγής του Ηνωμένου Βασιλείου υπάρχει επίσης μια χαρακτηριστική έλλειψη

(Y144 del) στο γονιδίωμα, που έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης αναγνώρισης και εργαστηριακής παρακολούθησης. Ωστόσο ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας αποδίδει σε αυτές τις παραλλαγές δυσκολία στον εντοπισμό τους στο εργαστήριο και ως εκ τούτου περιορίζεται η αποτελεσματικότητα των μέτρων πρόληψης και ελέγχου της δημόσιας υγείας. Θεωρείται γενικά ότι οι μεταλλάξεις N501Y και E848K μπορεί να προσδώσουν πλεονεκτήματα προσαρμογής στον SARS-CoV-2. Πρόσφατα, τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (Centers for Disease Control and Prevention, CDC), στις Ηνωμένες Πολιτείες, έχουν προσθέσει δύο παραλλαγές στη λίστα των παραλλαγών ανησυχίας, τη B.1.427 και τη B.1.429 από την Καλιφόρνια. Και οι δύο φέρουν τις μεταλλάξεις L452R και D614G.

- iii. Παραλλαγές υψηλού κινδύνου **Variants of high consequence**: είναι εκείνες οι παραλλαγές που επιφέρουν τις σοβαρότερες κλινικές επιπτώσεις. Αυτή η κατηγορία αναγνωρίζεται μόνο από το CDC και περιλαμβάνει παραλλαγές που σχετίζονται με ολοκληρωτική απώλεια της αποτελεσματικότητας των εμβολίων και της θεραπείας με μονοκλωνικά αντισώματα. Σε αυτές θα μπορούσαν επίσης να συμπεριληφθούν παραλλαγές ανθεκτικές στα αντικά. Προς το παρόν καμία από τις παραλλαγές του SARS-CoV-2 δεν έχει ταξινομηθεί σε αυτήν την κατηγορία. Αξίζει να σημειωθεί ότι το Ευρωπαϊκό Κέντρο Νοσημάτων και Προστασίας (European Center for Diseases and Prevention, ECDC), τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CDC) και ο Παγκόσμιος οργανισμός υγείας (World Health Organization, WHO) αποδίδουν τις ετικέτες «ενδιαφέροντος» ή «ανησυχίας» για την ίδια παραλλαγή ανάλογα με τη γεωγραφική θέση και την εξάπλωση της. Επίσης, η ίδια παραλλαγή μπορεί αρχικά να ταξινομηθεί ως «ενδιαφέροντος» και στη συνέχεια να κλιμακωθεί σε «ανησυχίας» και το αντίστροφο.

## Τύποι παραλλαγών ανησυχίας SARS-CoV-2 (Variants of concern)

### *Παραλλαγή Alpha (B.1.1.7)*

Οι μεταλλάξεις ακίδας της παραλλαγής Alpha περιλαμβάνουν τις μετάλλαξεις N501Y, P681H και απαλοιφές του NTD στο RBD στις θέσεις 69–70 και Y144. Η απαλοιφή στις θέσεις 69–70 αποτρέπει την ενίσχυση ενός εκ των τριών γονιδιωματικών τμημάτων σε μια ευρέως χρησιμοποιούμενη διαγνωστική ανάλυση PCR δημιουργώντας το φαινόμενο που αναφέρεται ως αποτυχία του γονιδίου-στόχου S (S-gene target failure, SGTf), που φυσιολογικά θα έπρεπε να λειτουργεί σε αυτήν την παραλλαγή<sup>176</sup>. Η παραλλαγή Alpha περιέχει επίσης αρκετές μεταλλάξεις μακριά από την πρωτεΐνη ακίδα συμπεριλαμβανομένων των nsr6:Δ106–108 και τις μεταλλάξεις D3L, R203K και G204R του νουκλεοκασιδίου, οι οποίες προκαλούν αύξηση της μεταδοτικότητας του ιού<sup>174,175</sup>.

Έως και το δεύτερο τρίμηνο του 2021, η παραλλαγή Alpha συνιστούσε την πλειοψηφία των μολύνσεων στις Ηνωμένες Πολιτείες και σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες<sup>177</sup>. Επιδημιολογικές μελέτες υποδηλώνουν ότι ήταν κατά 50% πιο μεταδοτική από τις προηγούμενες παραλλαγές που εντοπίστηκαν στο Ηνωμένο Βασίλειο<sup>178-179</sup>. Συσχετίστηκε επίσης με τριπλάσια έως και οκταπλάσια αύξηση των επιπέδων των ιών στην ανώτερη αναπνευστική οδό και διπλάσια αύξηση της θνησιμότητας.<sup>180-183</sup>

Η παραλλαγή Alpha περιορίζεται από τα περισσότερα εξουδετερωτικά mAbs καθώς και από το πλάσμα νοσούντων στο παρελθόν ατόμων<sup>184-186</sup>. Το γεγονός αυτό καθιστά τον κίνδυνο επαναμόλυνσης σχετικά μειωμένο<sup>187</sup>. Η παραλλαγή Alpha έχει 3 - 10 φορές μειωμένη ευαισθησία στο 15% περίπου του πλάσματος των εμβολιασμένων ατόμων<sup>188-189</sup>. Στο Ισραήλ και το Κατάρ χορηγήθηκε το εμβόλιο BNT162b το οποίο εμφάνισε 90%<sup>190,191</sup> αποτελεσματικότητα έναντι αυτής της παραλλαγής. Σε μια μεταανάλυση της κλινικής δοκιμής NVX-CoV2373, η αποτελεσματικότητα του εμβολίου ήταν 86,3% για την παραλλαγή Alpha αναλογικά με το 96,4% των προγενέστερων παραλλαγών<sup>192</sup>.

Έχουν προκύψει αρκετές υποκατηγορίες της παραλλαγής Alpha και επιπλέον μεταλλάξεις που μπορεί να αυξήσουν τον κίνδυνο επαναμόλυνσης και την εξουδετέρωση της δράσης των εμβολίων<sup>193</sup> συμπεριλαμβανομένων των μεταλλάξεων RBDE484K, F490S και S494P.

### ***Παραλλαγή Beta (B.1.351)***

Μεταξύ Οκτωβρίου 2020 και Ιανουαρίου 2021, καθημερινά τα κρούσματα στη Νότια Αφρική αυξάνονταν από περίπου 2.000 σε περισσότερα από 20.000 την ημέρα. Αυτή η αύξηση σημειώθηκε σε ένα περιβάλλον όπου περισσότερο από το 30% του πληθυσμού θεωρείται ότι ήταν ήδη μολυσμένο και συνδέθηκε με την εμφάνιση της παραλλαγής Beta, η οποία περιέχει τρεις μεταλλάξεις στο RBD (K417N, E484K και N501Y) και πέντε μεταλλάξεις στο NTD, συμπεριλαμβανομένης μιας έλλειψης εντός της περιοχής NTD στις θέσεις 242–244. Η παραλλαγή Beta εκτιμήθηκε ότι ήταν 50% πιο μεταδοτική από τις προγενέστερες γενεαλογίες<sup>194</sup>.

Επαναλοιμώξεις με την παραλλαγή Beta παρατηρήθηκαν συχνά κατά τη πειραματική χορήγηση του εμβολίου NVX-CoV2373 που δοκιμάστηκε στη Νότια Αφρική (το ένα τρίτο των λοιμώξεων τόσο σε εμβολιασμένους όσο και σε placebo αφορούσαν επαναμολύνσεις)<sup>195</sup>. Δεν είναι γνωστό αν η παραλλαγή Beta επηρεάζει τα επίπεδα ιικού φορτίου και τη βαρύτητα της νόσου. Από τον Ιούνιο του 2021 θεωρείται υπεύθυνη για περισσότερο από το 50% των λοιμώξεων σε πολλές υποσαχάριες χώρες της Αφρικής<sup>177</sup>.

Η παραλλαγή Beta σχετίζεται με μειωμένη ευαισθησία σε πολλά mAbs επειδή η μετάλλαξη E484K παρεμβαίνει στη δέσμευση mAbs RBM τύπου 1 και 2 και η K417N στη δέσμευση πολλών RBM mAbs τύπου I<sup>196</sup>. Από τα πέντε mAbs που έχουν εγκριθεί από τον FDA (Food and Drug Administration) ύστερα από την εξουσιοδότηση της EUA (Emergency Use Authorization), το bamlanivimab, το etesevimab και το casirivimab είναι σε μεγάλο βαθμό ανενεργά έναντι της B.1.351 ενώ το imdevimab και το sotrovimab, που συνδέονται με τον πυρήνα του RBD διατηρούν την δραστηριότητά τους<sup>184</sup>.



Από 34 δείγματα πλάσματος ανάρρωσης ατόμων προσβεβλημένων από την παραλλαγή Alpha, στο 59% υπήρχε 3 – 10 φορές και στο 18% περισσότερο από 10 φορές μειωμένη εξουδετερωτική δραστικότητα των κυκλοφορούντων αντισωμάτων ως προς την παραλλαγή Beta<sup>197-199</sup>. Αντίστροφα, το πλάσμα 22 ατόμων μολυσμένων με την παραλλαγή Beta το 90% διατήρησε μερικώς ή πλήρως την εξουδετερωτική του δραστικότητα<sup>200</sup>.

Μεταξύ ατόμων εμβολιασμένων με ένα από τα mRNA εμβόλια, το 45% είχε από τριπλάσια έως και δεκαπλάσια μείωση της ευαισθησίας ενώ το 30% είχε περισσότερο μειωμένη εξουδετερωτική δραστικότητα ενάντι της παραλλαγής Beta<sup>188,189</sup>. Σε άτομα που χορηγήθηκε το εμβόλιο AZD1222, στο 42% υπήρξε υποτριπλάσια έως και υποδεκαπλάσια δραστικότητα και στο 54% ακόμα χαμηλότερη. Η αποτελεσματικότητα των εμβολίων σαφώς είχε μειωθεί ύστερα από την εμφάνιση της παραλλαγής Beta<sup>201</sup>. Σε μια δοκιμή της φάσης II του AZD1222 στη Νότια Αφρική, που εφαρμόστηκε σε 39 άτομα, η αποτελεσματικότητα του εμβολίου εκτιμάται ότι ήταν μόλις 10%<sup>201</sup>.

### ***Παραλλαγή Gamma (P.1)***

Η παραλλαγή Gamma περιέχει τις RBD μεταλλάξεις N501Y, E484K και K417T<sup>202</sup>. Περιλαμβάνει επίσης πέντε NTD μεταλλάξεις, εκ των οποίων η L18F έχει αποδειχθεί ότι παρεμβαίνει στη δέσμευση των αντισωμάτων στόχευσης στο NTD<sup>203</sup>. Καθώς η παραλλαγή Gamma συνδέθηκε με ένα κύμα λοιμώξεων σε μια περιοχή της Βραζιλίας που εκτιμάται ότι ήδη υπήρχε υψηλό ποσοστό μολύνσεων, είναι πιθανή η πρόκληση ασθένειας σε άτομα που είχαν ήδη μολυνθεί στο παρελθόν με άλλες παραλλαγές<sup>202</sup>. Οι ειδικοί υπολόγιζαν ότι θα επιφέρει τριπλάσια με τετραπλάσια αύξηση στα επίπεδα του ιικού φορτίου σε σχέση με τις προηγούμενες παραλλαγές και υψηλότερη θνησιμότητα κατά 1,1 - 1,8 φορές<sup>202</sup>. Μέχρι τον Ιούνιο του 2021, η παραλλαγή Gamma αντιπροσώπευε ένα υψηλό ποσοστό λοιμώξεων σε αρκετές χώρες της Νότιας Αμερικής και της Καραϊβικής και το 10% των λοιμώξεων στις Ηνωμένες Πολιτείες<sup>177</sup>. Η αντίσταση που φέρουν τα mAbs στην παραλλαγή Gamma, είναι παρόμοια με αυτήν της παραλλαγής Beta<sup>196</sup>.

Από δείγματα πλάσματος που λήφθηκαν από άτομα που είχαν μολυνθεί με πρώιμες παραλλαγές πανδημίας ή με την παραλλαγή Alpha, περίπου το 20% είχε τριπλάσια έως δεκαπλάσια μείωση της εξουδετερωτικής δραστηριότητας και ένα 10% εμφάνισε ακόμα πιο σημαντική μείωση<sup>196</sup>. Σε δείγματα πλάσματος ατόμων που λαμβάνουν ένα από τα δύο εξουσιοδοτημένα εμβόλια mRNA περίπου το 60% είχε τριπλάσια έως και δεκαπλάσια μείωση της αποτελεσματικότητας της δράσης τους και το 5% εμφάνισε ακόμα χαμηλότερη εξουδετερωτική δραστηριότητα<sup>196</sup>. Παρόμοια κατανομή στη μείωση της εξουδετερωτικής δραστηριότητας παρατηρήθηκε και σε δείγματα πλάσματος εμβολιασμένων με το εμβόλιο AZD1222<sup>204</sup>.

### ***Παραλλαγή Delta (B.1.617.2)***

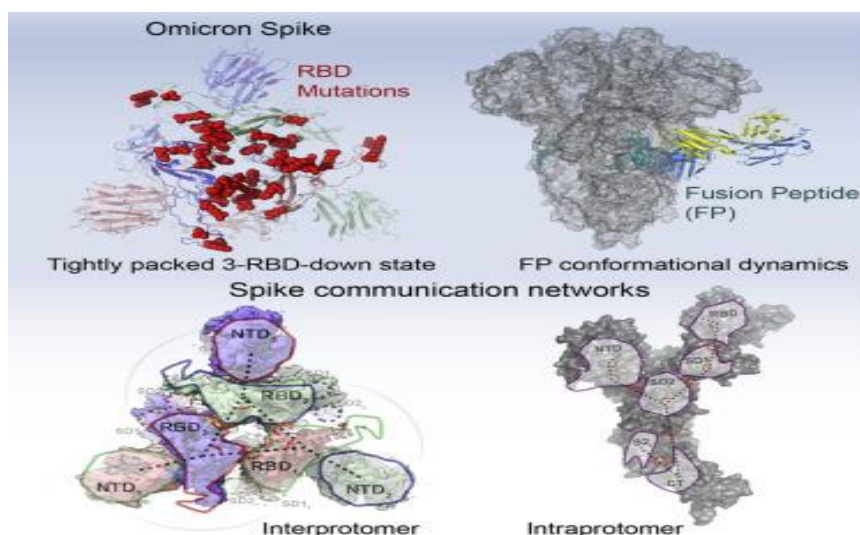
Στην Ινδία, καθώς η πανδημία έφτανε στο αποκορύφωμα της στις αρχές του 2021, δύο παραλλαγές που μοιράζονται έναν κοινό πρόγονο, οι Delta (B.1.617.2) και Kappa (B.1.617.1), αντιπροσώπευαν ένα υψηλό ποσοστό λοιμώξεων. Οι δύο παραλλαγές πιθανώς προήλθαν από ένα κοινό πρόγονο στο διάστημα μεταξύ Αυγούστου και Οκτωβρίου του 2020. Και οι δύο παραλλαγές περιέχουν την RBD μετάλλαξη L452R, τη μετάλλαξη P681R και αρκετές μεταλλάξεις εντός των *orf3*, *orf7a* και του γονιδίου του νουκλεοκαψιδίου. Η παραλλαγή Kappa περιείχε την RBD μετάλλαξη E484Q ενώ η παραλλαγή Delta περιείχε την RBD μετάλλαξη T478K. Οι δύο παραλλαγές περιέχουν επίσης διαφορετικές μεταλλάξεις στο NTD της πρωτεΐνης ακίδας. Παρόλο που η E484Q είναι πιο πιθανό να ξεφύγει της εξουδετέρωσης των αντισωμάτων σε σχέση με την T478K<sup>205</sup>, η παραλλαγή Delta αποδείχθηκε πιο μεταδοτική και σύντομα αντικατέστησε την παραλλαγή Alpha στο Ηνωμένο Βασίλειο<sup>206</sup> και τις Ηνωμένες Πολιτείες<sup>207</sup>.

Από τα mAbs που έχουν εγκριθεί από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA), η παραλλαγή Delta σχετίζεται με υψηλού βαθμού μείωση της ευαισθησίας στο bamlanivimab. Έχει ως αποτέλεσμα περίπου 3 - 10 φορές μειωμένη ευαισθησία στο 45% και περισσότερο μειωμένη ευαισθησία στο 5% στο πλάσμα από ασθενείς που ανάρρωσαν<sup>205</sup>. Μεταξύ των δειγμάτων πλάσματος ατόμων εμβολιασμένων με το εμβόλιο

BNT162b, περίπου το 15% εμφάνισε τριπλάσια με δεκαπλάσια μείωση της εξουδετερωτικής δραστηριότητας έναντι της παραλλαγής Delta<sup>205</sup>. Αντίθετα, μεταξύ των δειγμάτων πλάσματος εμβολιασμένων με το AZD1222 ήταν υψηλότερα τα ποσοστά μειωμένης εξουδετερωτικής δραστηριότητας έναντι της παραλλαγής<sup>205</sup>. Σε μελέτες περιστατικών ελέγχου στο Ηνωμένο Βασίλειο το εμβόλιο BNT162b ήταν περίπου 85% αποτελεσματικό για την παραλλαγή Delta<sup>208</sup> ενώ το εμβόλιο AZD1222 κοντά στο 60%. Αναφέρθηκαν πρόσφατα υποκατηγορίες της παραλλαγής Delta που έχουν αναπτύξει επιπλέον μεταλλάξεις όπως η K417N<sup>177</sup>.

### ***Παραλλαγή Omicron (B.1.1.529)***

Στις 24 Νοεμβρίου 2021 ο υπουργός Υγείας της Νότιας Αφρικής ανέφερε την εμφάνιση μιας νέας και ταχέως εξαπλούμενης παραλλαγής του SARS-CoV-2 που ανακαλύφθηκε από το εθνικό δίκτυο γονιδιωματικής επιτήρησης της χώρας. Μόλις 2 μέρες αργότερα, ο ΠΟΥ ανακύρηξε αυτή την παραλλαγή ως την πέμπτη παραλλαγή ανησυχίας (VOC) του SARS-CoV-2 που ονομάστηκε Omicron (B.1.1.529). Παρά τις πολύ περιορισμένες πληροφορίες σχετικά με τη μεταδοτικότητα και την παθογένεια της παραλλαγής, η Omicron προκάλεσε την έντονη ανησυχία των ειδικών επειδή ήταν ο εντυπωσιακά υψηλός ο αριθμός των παρατηρούμενων μεταλλάξεων, ειδικά στον πρωτεΐνη Spike.



Εικόνα 7: Δομή της παραλλαγής Omicron

## Τύποι παραλλαγών ειδικού ενδιαφέροντος SARS-CoV-2 (Variants of interest)

**Η παραλλαγή Epsilon** περιλαμβάνει δύο στενά σχετιζόμενες σειρές: τη **B.1.427** και τη **B.1.429** που εντοπίστηκαν για πρώτη φορά στην Καλιφόρνια. Αυτή η παραλλαγή ήταν η πρώτη που αναφέρθηκε ότι περιείχε την RBD μετάλλαξη L452R. Υπολογίστηκε ότι ήταν περίπου 20% πιο μεταδοτική από τις ήδη υπάρχουσες γενεαλογίες και συσχετίστηκε με διπλάσια ιικά επίπεδα στους αεραγωγούς του ανώτερου αναπνευστικού<sup>209</sup>. Μέχρι τον Φεβρουάριο του 2021 η παραλλαγή Epsilon αποτελούσε το 15% των μολύνσεων στις ΗΠΑ. Ωστόσο τον Ιούνιο του ίδιου έτους, ο επιπολασμός μειώθηκε κάτω από 1%.

Σε αντίθεση με την παραλλαγή Delta, **η παραλλαγή Kappa (B.1.617.1)** δεν έχει ιδιαίτερα υψηλή μεταδοτικότητα. Ωστόσο λόγω της παρουσίας των RBD μεταλλάξεων L452R και E484Q, η παραλλαγή Kappa έχει συγκριτικά με τη Delta μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στη χυμική ανοσία. Εμφανίζει μειωμένη ευαισθησία στα mAbs casirivimab και bamlanivimab. Από δείγματα πλάσματος ανάρρωσης, περίπου το 40% είχε τριπλάσια έως δεκαπλάσια μείωση της εξουδετερωτικής δραστηριότητας και το 15% ακόμα μεγαλύτερη<sup>205</sup>. Από τα δείγματα πλάσματος εμβολιασμένων με mRNA εμβόλιο, το 55% είχε τριπλάσια έως δεκαπλάσια πτώση της δραστηριότητας και το 5% μεγαλύτερη<sup>205</sup>.

**Οι παραλλαγές Iota (B.1.526), Eta (B.1.525) και Zeta (P.2)** έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό τη RBD μετάλλαξη E484K. Η **παραλλαγή Iota** αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στη Νέα Υόρκη τον Ιούνιο του 2021, είχε επιπολασμό 5–10% στις Ηνωμένες Πολιτείες ωστόσο δεν εξαπλώθηκε διεθνώς<sup>210</sup>. Περιλαμβάνει την απαλοιφή nsr6 όπως οι παραλλαγές Alpha, Beta και Gamma. Από τα δείγματα πλάσματος ανάρρωσης, περίπου το 40% παρουσίασε τριπλάσια έως και δεκαπλάσια μείωση της εξουδετερωτικής δραστηριότητας και στο 10% παρουσιάστηκε ακόμα σημαντικότερη μείωση<sup>211</sup>. Στα δείγματα πλάσματος εμβολιασμένων με mRNA εμβόλιο, περίπου το 30% εμφάνισε τρεις έως δέκα φορές μειωμένη δραστηριότητα<sup>211</sup>. Η **παραλλαγή Eta** εντοπίστηκε σε πολλές χώρες έστω και σε χαμηλά επίπεδα, με τη

Νιγηρία να έχει το υψηλότερο ποσοστό λοιμώξεων<sup>212</sup>. Η αποτελεσματικότητα των mAbs ως προς την εξουδετέρωση της παραλλαγής Eta δεν έχει μελετηθεί εκτενώς<sup>213</sup>. Η *παραλλαγή Zeta* κυριάρχησε στη Βραζιλία στα τέλη του 2020 και στις αρχές του 2021 αλλά ο επιπολασμός σταδιακά μειώθηκε<sup>193</sup>.

Η *παραλλαγή Theta (P.3)* καταγράφηκε για πρώτη φορά τον Μάρτιο του 2021 στις Φιλιππίνες<sup>177</sup>. Περιέχει 13 μεταλλάξεις που καθορίζουν τη γενεαλογία, συμπεριλαμβανομένων των N501Y, E484K, P681H και απαλοιφής στις θέσεις 141–143 του NTD<sup>214</sup>. Ωστόσο, η συχνότητα εμφάνισης της ήταν μικρή, αντιπροσωπεύοντας ένα μικρό ποσοστό λοιμώξεων ακόμη και στις Φιλιππίνες<sup>215</sup>.

Η *παραλλαγή Lambda (C.37)* έχει ένα μοναδικό σύνολο μεταλλάξεων στην πρωτεΐνη ακίδα, συμπεριλαμβανομένων των L452Q και F490S εντός της RBD και απαλοιφής Δ246–252 στο NTD<sup>215</sup>. Θεωρείται ιδιαίτερα διαδεδομένη σε αρκετές χώρες της Νότιας Αμερικής και επηρέασε την ευαισθησία του τοπικά χορηγούμενου εμβολίου CoronaVac<sup>216</sup>.

## B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### *Διαγνωστικά εργαλεία για την ταυτοποίηση των παραλλαγών*

Ο προσδιορισμός και ο χαρακτηρισμός των παραλλαγών επιτυγχάνεται με την χρήση εργαλείων της μοριακής βιολογίας και την εφαρμογή προγραμμάτων βιοπληροφορικής που έχουν σχεδιαστεί ειδικά για αυτόν τον σκοπό. Ουσιαστικά, δύο είναι οι βασικές στρατηγικές:

Η **πρώτη στρατηγική** προϋποθέτει την πλήρη αλληλούχηση του γονιδιώματος του ιού, με σκοπό τον εντοπισμό των πιθανών μεταλλάξεων συγκρίνοντας την αλληλουχία της παραλλαγής με εκείνη του αρχικού στελέχους που απομονώθηκε στη Wuhan. Ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στις περιοχές που βρίσκονται κοντά στην πρωτεΐνη spike καθώς εκεί παρατηρούνται οι πιθανές αντιγονικές αλλαγές που μπορούν να διαφοροποιήσουν τη μεταδοτικότητα, την παθογένεια, την κλινική σημαντικότητα και τη διαφυγή από την ανοσία.

Η διαδικασία προσδιορισμού της ιικής αλληλουχίας στο εργαστήριο προαπαιτεί προετοιμασία του δείγματος, αντίστροφη μεταγραφή (μετατροπή του RNA σε DNA), δημιουργία βιβλιοθηκών (θραύσματα προς αλληλούχηση) και χρήση τεχνικών αλληλούχησης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) που μας επιτρέπει τη μαζική και παράλληλη αλληλούχηση του γονιδιώματος μέσω της εφαρμογής των μεθόδων Illumina και Ion Torrent. Μόλις ταυτοποιηθεί η ακολουθία των νουκλεοτιδικών βάσεων, τα δεδομένα εισάγονται σε ειδικά προγράμματα βιοπληροφορικής για τη συναρμολόγηση των θραυσμάτων, την ανίχνευση μεταλλάξεων, τον έλεγχο πιθανών ανασυνδυασμών και στη συνέχεια γίνεται σύγκριση των δύο αλληλουχιών.

Έτσι καθίσταται δυνατή μια εκτενέστερη και πιο λεπτομερής ανάλυση που εντοπίζει πρόσθετες μεταλλάξεις σε ήδη γνωστές παραλλαγές ή την εμφάνιση νέων παραλλαγών. Αφού προσδιοριστεί η ακολουθία που επισημαίνεται συνήθως με ένα όνομα, οι πληροφορίες αποστέλλονται στο σύστημα πληροφοριών Δημόσιας Υγείας και κοινοποιείται ελεύθερα σε προσβάσιμες ιστοσελίδες. Η πιο διαδεδομένη ιστοσελίδα είναι το GISAID (Global Initiative on Sharing All

Influenza Data) που προοριζόταν αρχικά για τη γρίπη και πλέον και για τον SARS-CoV-2.

Η **δεύτερη στρατηγική**, η οποία δεν προϋποθέτει την πλήρη γνώση του γονιδιώματος του SARS-CoV-2, είναι η ενίσχυση μόνο των τμημάτων του γονιδίου που είναι υπεύθυνα για την πρωτεΐνη S της οποίας οι μεταλλάξεις προσδίδουν μια χαρακτηριστική ταυτότητα στην κάθε παραλλαγή. Με αυτόν τον τρόπο, οι παραλλαγές επισημαίνονται ανάλογα την παρουσία ή την απουσία συγκεκριμένων μεταλλάξεων. Η στρατηγική αυτή χρησιμοποιείται ευρέως σε προσυμπτωματικό έλεγχο για συγκεκριμένες παραλλαγές, και για αυτό τον λόγο, υπάρχουν διάφορα εμπορικά κιτ που στοχεύουν ειδικές περιοχές του γονιδίου S που φέρουν πιθανές μεταλλάξεις. Εργαστήρια με μεγαλύτερη εμπειρία εφαρμόζουν μια διαφορετική στρατηγική, σχεδιάζοντας ειδικούς εκκινητές για την ενίσχυση των προσβεβλημένων περιοχών του γονιδίου της πρωτεΐνης spike και ανιχνεύουν άμεσα τις μεταλλάξεις.

Ειδική περίπτωση είναι η παραλλαγή B.1.1.7 του Ηνωμένου Βασιλείου που χαρακτηρίζεται από μια απαλοιφή στην περιοχή του κορμού του γονιδιώματος<sup>171</sup>. Η B.1.1.7 παρουσιάζει απώλεια νουκλεοτιδίων στις θέσεις 69 και 70 σε αυτή την πρωτεΐνη (Δ69-70) με αποτέλεσμα όταν επιχειρείται η ενίσχυση της περιοχής με εκκινητές, να παράγεται ένα αρνητικό αποτέλεσμα. Η έλλειψη ενίσχυσης αυτής της περιοχής (δείκτης SGTF, S-gene target failure) σε συνδυασμό με την ενίσχυσή της με άλλους εκκινητές σε δύο άλλες περιοχές, ήταν καθοριστική για την ιχνηλάτηση της σε παγκόσμιο επίπεδο<sup>172,173</sup>.

Ένα μειονέκτημα της στρατηγικής της στοχευμένης ενίσχυσης αποτελεί η πιθανή παρουσία πρόσθετων μεταλλάξεων που δεν μπορούν να ανιχνευτούν και έτσι μερικά στελέχη να επισημαίνονται ως γνωστές παραλλαγές ενώ στην πραγματικότητα αποτελούν νέες. Αυτό το φαινόμενο έχει παρατηρηθεί με την παραλλαγή B.1.1.7 που σε ορισμένες περιπτώσεις περιλαμβάνει τη μετάλλαξη E484K. Ωστόσο, η ανάκτηση αποτελεσμάτων είναι ταχύτερη σε σχέση με την πρώτη μέθοδο που μπορεί να διαρκέσει τρεις με πέντε μέρες, ανάλογα την αυτοματοποίηση των βημάτων που απαιτούνται.

## Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να μελετηθούν οι μεταλλάξεις 452R, 452Q, 484K, 484A, 484Q, 501Y και 498R, του γονιδίου S του SARS-CoV-2 μέσω μιας ποιοτικής διαδικασίας που περιλαμβάνει την αντίστροφη μεταγραφή, την ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων και την ανάλυση καμπυλών τήξεως.

Πληθυσμό της μελέτης αποτέλεσαν ρινοφαρυγγικά δείγματα ατόμων που είχαν μολυνθεί από τον ιό στο νοσοκομείο ΑΙΓΙΝΗΤΕΙΟ από τον Μάιο 2020 έως και τον Μάρτιο 2022.

Η ανάλυση είναι σε θέση να ανιχνεύσει τις μεταλλάξεις που σχετίζονται με τις ακόλουθες παραλλαγές: την παραλλαγή Alpha (B.1.1.7), την παραλλαγή Beta (B.1.35), παραλλαγή Gamma (P1), γενεαλογία, παραλλαγή Delta (B.1.617.2), παραλλαγή Kappa (B.1.617.1), η παραλλαγή Epsilon (B.1.427/9), η παραλλαγή Eta (B.1.525), η παραλλαγή Iota (B.1.526), η παραλλαγή Λάμδα (C.37) και η παραλλαγή Mu (B.1.621) και η παραλλαγή Omicron (B.1.1.529).



## Υλικά και μέθοδοι

### Σχεδιάγραμμα

Τα στοιχεία μας σχετικά με τις μεταλλάξεις και τις υπό μελέτη παραλλαγές προήλθαν από την εφαρμογή του διαγνωστικού αλγορίθμου, όπως περιγράφεται παρακάτω.

Συγκεκριμένα ελήφθησαν δείγματα θετικών για τον ιό SARS-CoV ασθενών που διαγνώστηκαν στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Αιγινήτειου Νοσοκομείου από τον Μάρτιο 2020 έως τον Μάιο 2022. Τα πρωτογενή κλινικά δείγματα είχαν ληφθεί από τον ρινοφάρυγγα και φυλάχθηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για περαιτέρω διερεύνηση.

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγινε επιλογή 200 δειγμάτων ισόποσα κατανεμημένων κατά την διετία της μελέτης. Αρχικά έγινε από κάθε κλινικό δείγμα εκ νέου εξαγωγή του γενετικού υλικού με την αυτοματοποιημένη δοκιμασία MagDEA Dx SV και με τη χρήση του μηχανήματος Maglead 12gC. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η εμπορική δοκιμασία SARS-CoV-2 Elite MGB με την οποία υπάρχει η δυνατότητα ανίχνευσης του ιού και ταυτόχρονα διαχωρισμού των μη μεταλλαγμένων στελεχών από τα μεταλλαγμένα στελέχη. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι η Reverse-Transcription Real Time PCR (rRT-PCR) και στοχεύει σε 2 γονίδια, πρώτον στο RdRp το οποίο ανιχνεύεται σε όλα τα στελέχη ανεξαρτήτων μεταλλάξεων και στο ORF8 το οποίο βοηθά στο διαχωρισμό των μεταλλαγμένων από τα μη μεταλλαγμένα στελέχη. Ωστόσο, με αυτή την τεχνική δεν ήταν εφικτός ο προσδιορισμός του τύπου των μεταλλάξεων και συνεπώς των παραλλαγών. Διαχωρίζει όμως τα μεταλλαγμένα και τα μη μεταλλαγμένα. Σε ένα σύνολο 200 δειγμάτων, τα 56 (28%) δεν έφεραν μεταλλάξεις και αυτό μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα δείγματα αυτά έφεραν πιθανώς το αρχικό στέλεχος της Wuhan. Μεγάλο μέρος των δειγμάτων αυτών είχε ληφθεί τους πρώτους μήνες του 2020, δηλαδή στην αρχή της πανδημίας, και αυτό μπορεί να εξηγεί την απουσία μεταλλάξεων.

Στη συνέχεια για τη τυποποίηση των μεταλλαγμένων στελεχών χρησιμοποιήθηκε η αυτοματοποιημένη δοκιμασία SARS-CoV-2 extended Elite MGB, η οποία έχει τη δυνατότητα ανίχνευσης των μεταλλάξεων L452R, E484K, E484Q, N501Y του γονιδίου S, το οποίο

κωδικοποιεί των πρωτεΐνη ακίδα (spike protein). Με την τεχνική αυτή ήταν πλέον εφικτός ο ακριβής προσδιορισμός του τύπου των μεταλλάξεων και βάσει του συνδυασμού αυτών να διαπιστώσουμε την παραλλαγή του ιού κάθε δείγματος. Έτσι, τα 144 δείγματα αναλύθηκαν για τον προσδιορισμό των μεταλλάξεων.

## Περιγραφή της αρχής των μεθόδων

### ***PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR, RT-PCR)***

Στο πρώτο σύστημα PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR, RT PCR) χρησιμοποιείται αφ' ενός βρωμιούχο αιθίδιο και αφ' ετέρου μια κάμερα CCD για την παρακολούθηση της εξέλιξης των αντιδράσεων ενίσχυσης μέσα σε κλειστό σωλήνα αντίδρασης. Υπάρχουν αρκετοί ιχνηθέτες και πολλές φθορίζουσες χρωστικές που εφαρμόζονται στην RT PCR. Οι παρεμβαλλόμενες σε δίκλωνο μόριο DNA (dsDNA) χρωστικές παρουσιάζουν ελάχιστο ή καθόλου φθορισμό όταν βρίσκονται ελεύθερες σε διάλυμα, ενώ παράγουν ποσοτική αύξηση του φθορισμού, όταν δεσμεύονται σε dsDNA. Η R-T PCR, σε αντίθεση με τη συμβατική PCR, επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του DNA μέσα σε ένα μεγάλο δυναμικό εύρος. Τα στάδια της ενίσχυσης και της ανάλυσης πραγματοποιούνται μέσα σε κλειστό σωλήνα, ώστε να μη χρειάζονται περαιτέρω τεχνικές ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού των προϊόντων ενίσχυσης (amplicons). Για τον ποσοτικό προσδιορισμό, η R-T PCR εκμεταλλεύεται την αναλογική σχέση του πρώτου κύκλου στον οποίο το προϊόν ενίσχυσης είναι σε ανιχνεύσιμη ποσότητα (threshold circle ή Ct) με τον αρχικό αριθμό των αντιγράφων του νουκλεϊκού στόχου. Η επαλήθευση της ενίσχυσης της ορθής αλληλουχίας μπορεί να επιτευχθεί με ανάλυση της καμπύλης τήξης του DNA.

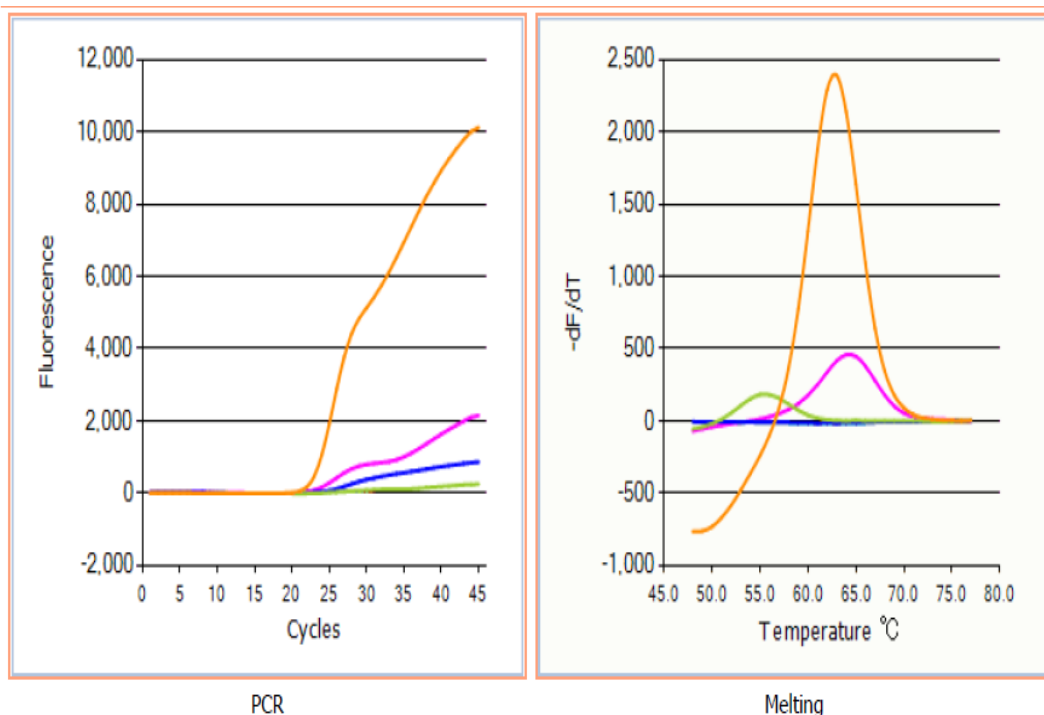
Η rtPCR έχει διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη διάγνωση πολλών αναπνευστικών λοιμώξεων που προέρχονται από RNA ιούς συμπεριλαμβανομένου και της νόσου COVID-19 καθώς και στην παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας αντιμικροβιακών θεραπειών.

### ***Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse-transcription Real Time PCR, rRT-PCR)***

Την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση (reverse-transcriptase PCR, rtPCR) την χρησιμοποιήσαμε για να πετύχουμε την ενίσχυση των RNA αλληλουχιών. Στη διαδικασία αυτή, οι RNA-στόχοι πρώτα μετατρέπονται σε συμπληρωματικό DNA (cDNA)

μέσω ενός ειδικού ενζύμου, της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase), και στη συνέχεια ενισχύονται με την κλασική μέθοδο της PCR.

Σε περίπτωση χρησιμοποίησης παρεμβαλλόμενων χρωστικών, προσμετράται η κινητική της αποδιάταξης του ενισχυμένου θραύσματος, ώστε να αποτυπωθεί η κλίση της καμπύλης τήξης σε σχέση με τη θερμοκρασία που επιτρέπει την τήξη του προϊόντος. Στις περιπτώσεις χρήσης ιχνηθέτη, τα υβρίδια αυτού με το προϊόν μπορούν να αναλυθούν με παρόμοιο τρόπο, μόνο που η θερμοκρασία τήξης προσδιορίζεται μέσω της αποδιάταξης του ιχνηθέτη από τον DNA-στόχο και όχι από τη θερμοκρασία τήξης του προϊόντος ενίσχυσης. Και στις δύο περιπτώσεις, η θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) είναι ανάλογη με το ποσοστό GC (γουανίνη-κυτοσίνη) στο εκάστοτε μελετώμενο δίκλωνο μόριο, από την απόλυτη σειρά των βάσεων στη μελετώμενη αλληλουχία και από το μήκος αυτής.



Sample Ct and Tm ranges:

Ct 452	Ct 484	Ct 501	Tm 452	Tm 484	Tm 501	Ct RNase P	Result
Det.	-	-	61.5 – 64.5	-	-	+/-	SARS-CoV-2 452L wild type
Det.	-	-	54.3 – 57.3	-	-	+/-	SARS-CoV-2 mutation L452R detected
Det.	-	-	57.4 – 59.7	-	-	+/-	SARS-CoV-2 mutation L452Q detected
-	Det.	-	-	65.9 – 68.8	-	+/-	SARS-CoV-2 484E wild type
-	Det.	-	-	59.4 – 61.9	-	+/-	SARS-CoV-2 mutation E484K detected
-	Det.	-	-	63.1 – 65.8	-	+/-	SARS-CoV-2 mutation E484A detected
-		Det.	-	-	56.5 - 58.7	+/-	SARS-CoV-2 501N wild type
-		Det.	-	-	62.6 - 65.6	+/-	SARS-CoV-2 mutation N501Y detected
-		Det.	-	-	54.6 – 56.4	+/-	SARS-CoV-2 presumptive Q498R+N501Y detected
Undet.	Undet.	Undet.	-	-	-	Ct < 35	SARS-CoV-2 NOT amplified
Undet.	Undet.	Undet.	-	-	-	Ct > 35	Invalid

**Note:** For the target 484 if Tm value falls within the Tm range 57.3 - 59.6, the 484Q mutation is detected in the sample.

Στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας, με βάση τον παραπάνω πίνακα και τις μεταλλάξεις που φέρει το κάθε δείγμα, μπορούμε να διακρίνουμε τις παραλλαγές

The following table gives an overview about the Sars-CoV-2 Variants to date widespread that could be associated with mutations detected by SARS-CoV-2 Extended ELITE MGB kit (RTS172ING).

		Mutations detected						Variants
452 Mutants		484 Mutants			501 Mutant			
452R	452Q	484K	484A	484Q	501Y	498R		
					✓		Alpha (UK) B.1.1.7	
		✓			✓		<ul style="list-style-type: none"> <li>Beta (South Africa) B.1.351</li> <li>Gamma (Brazil) P.1</li> <li>Mu (Colombia) B.1.621</li> <li>Theta (Philippines variant) P.3</li> </ul>	
✓							<ul style="list-style-type: none"> <li>Delta (India) B.1.617.2</li> <li>Epsilon (USA) B.1.427/9</li> </ul>	
✓				✓			Kappa (India) B.1.617.1*	
		✓					<ul style="list-style-type: none"> <li>Eta (Multiple countries) B.1.525</li> <li>Iota (USA) B.1.526</li> <li>Zeta (Brazil variant) P. 2</li> </ul>	
	✓						<ul style="list-style-type: none"> <li>Lambda (Perù) C.37</li> <li>VUI-21OCT-01 (N.A) Delta sublineage AY.4.2</li> </ul>	
			✓			✓	Omicron (N.A) B.1.1.529	

Εικόνα 8: συσχέτιση μεταλλάξεων παραλλαγών



### *X.3 Στατιστική ανάλυση - αποτελέσματα*

Στους ακόλουθους πίνακες καταγράφονται τα ποσοστά των μεταλλάξεων και των υπό μελέτη παραλλαγών.

Πίνακας X.3.1. Μεταλλάξεις 452R και 452Q

#### **452R**

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 0	117	81.3	81.3	81.3
1	27	18.8	18.8	100.0
Total	144	100.0	100.0	

#### **452Q**

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 0	144	100.0	100.0	100.0

Πίνακας X.3.2. Μεταλλάξεις 484K, 484A και 484Q

#### **484K**

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 0	140	97.2	97.2	97.2
1	4	2.8	2.8	100.0
Total	144	100.0	100.0	

#### **484A**

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 0	38	26.4	26.4	26.4
1	106	73.6	73.6	100.0
Total	144	100.0	100.0	

Πίνακας Χ.3.3. Μεταλλάξεις 501Y και 498R

**501Y**

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 0	78	54.2	54.2	54.2
1	66	45.8	45.8	100.0
Total	144	100.0	100.0	

**498R**

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 0	80	55.6	55.6	55.6
1	64	44.4	44.4	100.0
Total	144	100.0	100.0	

Ο συνδυασμός των διαφόρων μεταλλάξεων οδήγησε στην τυποποίηση των παρακάτω παραλλαγών:

Πίνακας Χ.3.4. Συχνότητα παραλλαγών

**Variants**

	Frequency	Percent	Valid Percent
Valid Alpha (UK) B. 1.1.7	5	3.5	3.5
Beta (South Africa) B.1.351	4	2.8	2.8
Delta (India) B. 1.617.2	28	19.4	19.4
Omicron (N.A) B. 1.1.529	105	72.9	72.9
Wild type	2	1.4	1.4
Total	144	100.0	100.0

## *Συζήτηση*

Σε ένα σύνολο 200 δειγμάτων ρινοφαρυγγικού επιχρίσματος ασθενών της Αθήνας τη διετία 2020-2022 τα 56 φαίνεται ότι έφεραν το αρχικό στέλεχος του ιού SARS-CoV-2. Τα υπόλοιπα δείγματα σύμφωνα με τις μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν φαίνεται ότι έφεραν νέες παραλλαγές του ιού.

Συγκεκριμένα, η παραλλαγή η οποία εμφανίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στο δείγμα μας είναι η Omicron (N.A.) B.1.1.529 με εμφάνιση 72,9%, ακολουθεί η παραλλαγή Delta (India) B.1.627.2 με εμφάνιση κατά 19,4% και με αρκετά χαμηλότερα ποσοστά ακολουθούν οι Alpha (UK) B.1.1.7 με 3,5%, η Beta (South Africa) B.1.351 με 2,8%. Δύο δείγματα (ποσοστό 1,4%) τα οποία αρχικά φάνηκε ότι έφεραν μεταλλάξεις δεν μπόρεσαν να τυποποιηθούν γιατί έφεραν μεταλλάξεις που δεν περιλαμβάνονται στην εμπορική δοκιμασία και τα οποία χρήζουν διερεύνησης μέσω Whole Genome Sequencing (WGS).

Οι ανιχνευθείσες παραλλαγές συμβαδίζουν με τη χρονική περίοδο που ελήφθησαν τα πρωτογενή δείγματα και με τα δεδομένα της τυποποίησης των παραλλαγών στη χώρα μας στις αντίστοιχες περιόδους.

Παρότι ο χαρακτηρισμός των παραλλαγών του ιού απαιτεί ανάλυση του γονιδιώματος του ιού με την τεχνολογία του Next Generation Sequencing (NGS) η χρήση των παραπάνω εμπορικών δοκιμασιών δίνει μια γρήγορη εικόνα των παραλλαγών που κυκλοφορούν.



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Cui, J., Li, F. & Shi, Z. L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 181–192 (2019).
2. Wu, J. T., Leung, K. & Leung, G. M. Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study. *Lancet* **395**, 689–697 (2020).
3. Hui, D. S. et al. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health - the latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *Intl. J. Infect. Dis.* **91**, 264–266 (2020).
4. Deng, S. Q. & Peng, H. J. Characteristics of and public health responses to the coronavirus disease 2019 outbreak in China. *J. Clin. Med.* **9**, 575 (2020).
5. Han, Q., Lin, Q., Jin, S. & You, L. Coronavirus 2019-nCoV: a brief perspective from the front line. *J. Infect.* **80**, 373–377 (2020).
6. Zhu, N. et al. A Novel Coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* **382**, 727–733 (2020).
7. Gralinski, L. E. & Menachery, V. D. Return of the coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses* **12**, 135 (2020).
8. Jiang, S., Du, L. & Shi, Z. An emerging coronavirus causing pneumonia outbreak in Wuhan, China: calling for developing therapeutic and prophylactic strategies. *Emerg. Microbes Infect.* **9**, 275–277 (2020).
9. Wu, Z. & McGoogan, J. M. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in china: summary of a report of 72314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA* **323**, 1239–1242
10. Wu, F. et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* **579**, 265–269 (2020).
11. Zhou, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* **579**, 270–273 (2020).

- 12.Chan, J. F. et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet* **395**, 514–523 (2020).
- 13.Chen, N. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* **395**, 507–513 (2020).
- 14.Wang, R., Zhang, X., Irwin, D. M. & Shen, Y. Emergence of SARS-like coronavirus poses new challenge in China. *J. Infect.* **80**, 350–371 (2020).
- 15.National Health Commission of the People’s Republic of China. Briefing on the latest situation of the novel coronavirus pneumonia epidemic. [http://www.nhc.gov.cn/xcs/yqtb/list\\_gzbd.shtml](http://www.nhc.gov.cn/xcs/yqtb/list_gzbd.shtml) (2020).
- 16.Eurosurveillance Editorial Team. Note from the editors: World Health Organization declares novel coronavirus (2019-nCoV) sixth public health emergency of international concern. *Euro. Surveill.* **25**, 200131e (2020).
- 17.Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* **5**, 536–544 (2020).
- 18.Fisher, D. & Heymann, D. Q&A: the novel coronavirus outbreak causing COVID-19. *BMC Med.* **18**, 57 (2020).
- 19.Lai, C. C., Shih, T. P., Ko, W. C., Tang, H. J. & Hsueh, P. R. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): the epidemic and the challenges. *Int. J. Antimicrob. Agents* **55**, 105924 (2020).
- 20.World Health Organization. Coronavirus disease 2019 (COVID-19). Situation report – [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200311-sitrep-51-covid-19.pdf?sfvrsn=1ba62e57\\_10](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200311-sitrep-51-covid-19.pdf?sfvrsn=1ba62e57_10) (2020).
- 21.Dong, E., Du, H. & Gardner, L. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *Lancet Infect. Dis.* **20**,

533–534 (2020).

22.Li, Q. et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N. Engl. J. Med.* **382**, 1199–1207 (2020).

23.Deslandes, A. et al. SARS-CoV-2 was already spreading in France in late December 2019. *Int. J. Antimicrob. Agents* **55**, 106006 (2020).

---

24.Li, F., Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annual review of virology* 2016, 3 (1), 237-261

25.NIH, Novel coronavirus structure reveals targets for vaccines and treatments. <https://www.nih.gov/news-events/nih-research-matters/novel-coronavirus-structure-reveals-targets-vaccines-treatment>

26.CDC Public Health Image Library. <https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=23312>

27. Wu, F.; Zhao, S.; Yu, B.; Chen, Y. M.; Wang, W.; Song, Z. G.; Hu, Y.; Tao, Z. W.; Tian, J. H.; Pei, Y. Y.; Yuan, M. L.; Zhang, Y. L.; Dai, F. H.; Liu, Y.; Wang, Q. M.; Zheng, J. J.; Xu, L.; Holmes, E. C.; Zhang, Y. Z., A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 2020, 579 (7798), 265-269.

28.Wrapp, D.; Wang, N.; Corbett, K. S.; Goldsmith, J. A.; Hsieh, C.-L.; Abiona, O.; Graham, B. S.; McLellan, J. S., Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 2020, 367 (6483), 1260.

29.<https://www.gisaid.org/>.

30.Yan, R.; Zhang, Y.; Li, Y.; Xia, L.; Guo, Y.; Zhou, Q., Structural basis for the recognition of the SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science* 2020, eabb2762.

31.Walls, A. C.; Park, Y.-J.; Tortorici, M. A.; Wall, A.; McGuire, A. T.; Veesler, D., Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*.

32.Mittal, A.; Manjunath, K.; Ranjan, R.K.; Kaushik, S.; Kumar, S.; Verma, V. COVID-19 pandemic: Insights into structure, function, and hACE2 receptor recognition by SARS-CoV-2. *PLoS Pathog.* 2020, 16, e1008762.

33. Neerukonda, S.N.; Katneni, U. A Review on SARS-CoV-2 Virology, Pathophysiology, Animal Models, and Anti-Viral Interventions. *Pathogens* 2020, 9, 426.
34. Kim, D.; Lee, J.-Y.; Yang, J.-S.; Kim, J.W.; Kim, V.N.; Chang, H. The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome. *Cell* 2020, 181, 914–921.
35. Schoeman, D.; Fielding, B.C. Coronavirus envelope protein: Current knowledge. *Viol. J.* 2019, 16, 1–22.
36. Kang, S.; Yang, M.; Hong, Z.; Zhang, L.; Huang, Z.; Chen, X.; He, S.; Zhou, Z.; Zhou, Z.; Chen, Q. Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites. *Acta Pharm. Sin. B* 2020, 10, 1228–1238.
37. Walls, A.C.; Park, Y.-J.; Tortorici, M.A.; Wall, A.; McGuire, A.T.; Veesler, D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell* 2020, 181, 281–292.
38. Andersen, K.G.; Rambaut, A.; Lipkin, W.I.; Holmes, E.C.; Garry, R.F. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat. Med.* 2020, 26,
39. McIntosh, K.; Hirsch, M.; Bloom, A. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): Epidemiology, virology, and prevention. *Lancet Infect. Dis.* 2020, 1, 2019–2020.
40. Walls, A. C. et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell* 181, 281–292.e6 (2020).
41. Wrapp, D. et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 367, 1260–1263 (2020).
42. Lan, J. et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* 581, 215–220 (2020).
43. Shang, J. et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature* 581, 221–224 (2020).
44. V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H. & Thiel, V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 155–170 (2020).
45. Carvalho, T., Krammer, F. & Iwasaki, A. The first 12 months of COVID-19: a timeline of immunological insights. *Nat. Rev. Immunol.* 21, 245–256 (2021).
46. Watanabe, Y. et al. Vulnerabilities in coronavirus glycan shields despite extensive glycosylation. *Nat. Commun.* 11, 2688 (2020).

47. Piccoli, L. et al. Mapping neutralizing and immunodominant sites on the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain by structure-guided high-resolution serology. *Cell* 183, 1024–1042.e21 (2020).
48. Weisblum, Y. et al. Escape from neutralizing antibodies by SARS-CoV-2 spike protein variants. *eLife* 9, e61312 (2020).
49. Wec, A. Z. et al. Broad neutralization of SARS-related viruses by human monoclonal antibodies. *Science* 369, 731–736 (2020).
50. Greaney, A. J. et al. Comprehensive mapping of mutations in the SARS-CoV-2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human plasma antibodies. *Cell Host Microbe* 29, 463–476.e6 (2021).
51. McCallum, M. et al. N-terminal domain antigenic mapping reveals a site of vulnerability for SARS-CoV-2. *Cell* 184, 2332–2347.e16 (2021).
52. Harvey, W. T. et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 409–424 (2021). This paper presents a comprehensive review of SARS-CoV-2 spike immune escape mutations.
53. McMahan, K. et al. Correlates of protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature* 590, 630–634 (2020).
54. Chandrashekar, A. et al. SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques. *Science* 369, 812–817 (2020).
55. Baden, L. R. et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N. Engl. J. Med.* 384, 403–416 (2021).
56. Polack, F. P. et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine. *N. Engl. J. Med.* 383, 2603–2615 (2020).
57. Walsh, E. E. et al. Safety and immunogenicity of two RNA-based COVID-19 vaccine candidates. *N. Engl. J. Med.* 383, 2439–2450 (2020).
58. Sahin, U. et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature* 586, 594–599 (2020).
59. Khoury, D. S. et al. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat. Med.* 27, 1205–1211 (2021). This paper presents a meta-analysis showing that the level of neutralizing antibodies elicited by a vaccine is strongly correlated with its efficacy.

60. Iwasaki, A. & Yang, Y. The potential danger of suboptimal antibody responses in COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 339–341 (2020).
61. Atyeo, C. et al. Distinct early serological signatures track with SARS-CoV-2 survival. *Immunity* 53, 524–532.e4 (2020).
62. Weinreich, D. M. et al. REGN-COV2, a neutralizing antibody cocktail, in outpatients with COVID-19. *N. Engl. J. Med.* 384, 238–251 (2021).
63. Garcia-Beltran, W. F. et al. COVID-19-neutralizing antibodies predict disease severity and survival. *Cell* 184, 476–488.e11 (2021).
64. Gottlieb, R. L. et al. Effect of bamlanivimab as monotherapy or in combination with etesevimab on viral load in patients with mild to moderate COVID-19: a randomized clinical trial. *JAMA* 325, 632–644 (2021)
65. Weinreich, D. et al. REGEN-COV antibody cocktail clinical outcomes study in COVID-19 outpatients. Preprint at medRxiv <https://doi.org/10.1101/2021.05.19.21257469> (2021).
66. Gupta, A. et al. Early COVID-19 treatment with SARS-CoV-2 neutralizing antibody sotrovimab. Preprint at medRxiv <https://doi.org/10.1101/2021.05.27.21257096> (2021).
67. Grubaugh ND, Petrone ME, Holmes EC. We shouldn't worry when a virus mutates during disease outbreaks. *Nat Microbiol.* 2020;5(4):529-530. doi:10.1038/s41564-020-0690-4
68. Korber B, Fischer WM, Gnanakaran S, et al; Sheffield COVID-19 Genomics Group. Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus. *Cell*.
69. Korber, B. et al. Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus. *Cell* 182, 812–827.e19 (2020).
70. Plante, J. A. et al. Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness. *Nature* 592, 116–121 (2020).
71. Hou, Y. J. et al. SARS-CoV-2 D614G variant exhibits efficient replication ex vivo and transmission in vivo. *Science* 370, 1464–1468 (2020).

72. Zhou, B. et al. SARS-CoV-2 spike D614G change enhances replication and transmission. *Nature* 592, 122–127 (2021).
73. Yurkovetskiy, L. et al. Structural and functional analysis of the D614G SARS-CoV-2 spike protein variant. *Cell* 183, 739–751.e8 (2020).
74. Benton, D. J. et al. Receptor binding and priming of the spike protein of SARS-CoV-2 for membrane fusion. *Nature* 588, 327–330 (2020).
75. Gobeil, S. M. C. et al. Effect of natural mutations of SARS-CoV-2 on spike structure, conformation, and antigenicity. *Science* 373, eabi6226 (2021).
76. Zhang, L. et al. SARS-CoV-2 spike-protein D614G mutation increases virion spike density and infectivity. *Nat. Commun.* 11, 6013 (2020).
77. Jackson, C. B., Zhang, L., Farzan, M. & Choe, H. Functional importance of the D614G mutation in the SARS-CoV-2 spike protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 538, 108–115 (2020).
78. Gobeil, S. M.-C. et al. D614G mutation alters SARS-CoV-2 spike conformation and enhances protease cleavage at the S1/S2 junction. *Cell Rep.* 34, 108630 (2021).
79. Weissman, D. et al. D614G spike mutation Increases SARS CoV-2 susceptibility to neutralization. *Cell Host Microbe* 29, 23–31.e4 (2021).
80. Zou, J. et al. The effect of SARS-CoV-2 D614G mutation on BNT162b2 vaccine-elicited neutralization. *NPJ Vaccines* 6, 1–4 (2021).
81. Zhu, X. et al. Cryo-electron microscopy structures of the N501Y SARS-CoV-2 spike protein in complex with ACE2 and 2 potent neutralizing antibodies. *PLoS Biol.* 19, e3001237 (2021).
82. Laffeber, C., de Koning, K., Kanaar, R. & Lebbink, J. H. G. Experimental evidence for enhanced receptor binding by rapidly spreading SARS-CoV-2 variants. *J. Mol. Biol.* 433, 167058 (2021).
83. Shen, X. et al. SARS-CoV-2 variant B.1.1.7 is susceptible to neutralizing antibodies elicited by ancestral spike vaccines. *Cell Host Microbe* 29, 529–539.e3 (2021).
84. Rees-Spear, C. et al. The effect of spike mutations on

- SARS-CoV-2 neutralization. *Cell Rep.* 34, 108890 (2021).
85. Edara, V. V. et al. Neutralizing Antibodies Against SARS-CoV-2 Variants After Infection and Vaccination. *JAMA* 325, 1896–1898 (2021).
86. Wu, K. et al. Serum neutralizing activity elicited by mRNA-1273 vaccine — preliminary report. *N. Engl. J. Med.* 384, 1468–1470 (2021).
87. Muik, A. et al. Neutralization of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 pseudovirus by BNT162b2 vaccine-elicited human sera. *Science* 371, 1152–1153 (2021).
88. Wang, Z. et al. mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants. *Nature* 592, 616–622 (2021).
89. Tegally, H. et al. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature* 592, 438–443 (2021)
90. Faria, N. R. et al. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science* 372, 815–821 (2021).
91. Annavajhala, M. K. et al. A novel SARS-CoV-2 variant of concern, B.1.526, identified in New York. Preprint at bioRxiv <https://doi.org/10.1101/2021.02.23.21252259> (2021).
92. Bascos, N. A. D., Mirano-Bascos, D. & Saloma, C. P. Structural analysis of spike protein mutations in an emergent SARS-CoV-2 variant from the Philippines. Preprint at bioRxiv <https://doi.org/10.1101/2021.03.06.434059> (2021).
93. Tablizo, F. A. et al. Genome sequencing and analysis of an emergent SARS-CoV-2 variant characterized by multiple spike protein mutations detected from the Central Visayas Region of the Philippines. Preprint at bioRxiv <https://doi.org/10.1101/2021.03.03.21252812> (2021).
94. Ferrareze, P. A. G. et al. E484K as an innovative phylogenetic event for viral evolution: genomic analysis of the E484K spike mutation in SARS-CoV-2 lineages from Brazil. *Infect. Genet. Evol.* 93, 104941 (2021).
- Grabowski, F., Preibisch, G., Giziński, S., Kochańczyk, M. & Lipniacki, T. SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 has about twofold replicative advantage and acquires concerning mutations. *Viruses* 13, 392 (2021).



95. Collier, D. A. et al. Sensitivity of SARS-CoV-2 B.1.1.7 to mRNA vaccine-elicited antibodies. *Nature* 593, 136–141 (2021).
96. Baum A, et al. Antibody cocktail to SARS-CoV-2 spike protein prevents rapid mutational escape seen with individual antibodies. *Science*. 2020;369:1014–1018.
97. Schmidt F, et al. Measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibody activity using pseudotyped and chimeric viruses. *J. Exp. Med.* 2020;217:e20201181.
98. Copin R, et al. The monoclonal antibody combination REGEN-COV protects against SARS-CoV-2 mutational escape in preclinical and human studies. *Cell*. 2021;184:3949–3961.
99. FDA. Fact sheet for health care providers emergency use authorization(EUA)ofbamlanivimab. *FDA.gov*<https://www.fda.gov/media/143603/download> (2021).
100. Chen RE, et al. Resistance of SARS-CoV-2 variants to neutralization by monoclonal and serum-derived polyclonal antibodies. *Nat. Med.* 2021;27:717–726.
101. Wang P, et al. Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7. *Nature*. 2021;593:130–135.
102. Greaney AJ, et al. Complete mapping of mutations to the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain that escape antibody recognition. *Cell Host Microbe*. 2021;29:44–57.e9.
103. Liu Z, et al. Identification of SARS-CoV-2 spike mutations that attenuate monoclonal and serum antibody neutralization. *Cell Host Microbe*. 2021;29:477–488.e4.
104. Jangra S, et al. SARS-CoV-2 spike E484K mutation reduces antibody neutralisation. *Lancet Microbe*. 2021;2:e283–e284.
105. Tada T, et al. Convalescent-Phase Sera and Vaccine-Elicited Antibodies Largely Maintain Neutralizing Titer against Global SARS-CoV-2 Variant Spikes. *mBio*. 2021;12:e0069621.
106. Liu, Z. et al. Identification of SARS- CoV-2 spike mutations that attenuate monoclonal and serum antibody neutralization. *Cell Host Microbe* 29,477–488.e4 (2021).
107. Jangra, S. et al. SARS- CoV-2 spike E484K mutation reduces antibody neutralisation. *Lancet Microbe* 2,e283–e284 (2021).

108. Tada, T. et al. Convalescent- Phase Sera and Vaccine- Elicited Antibodies Largely Maintain Neutralizing Titer against Global SARS- CoV-2 Variant Spikes. *mBio* 12, e0069621 (2021).
109. Collier, D. A. et al. Sensitivity of SARS- CoV-2 B.1.1.7 to mRNA vaccine- elicited antibodies. *Nature* 593,136–141 (2021).
110. Wang, R. et al. Analysis of SARS- CoV-2 variant mutations reveals neutralization escape mechanisms and the ability to use ACE2 receptors from additional species. *Immunity* 54, 1611-1621.e5 (2021).
111. Chen, J., Wang, R., Wang, M. & Wei, G.-W. Mutations strengthened SARS- CoV-2 infectivity. *J. Mol. Biol.* 432, 5212–5226 (2020).
112. Thomson, E. C. et al. Circulating SARS- CoV-2 spike N439K variants maintain fitness while evading antibody- mediated immunity. *Cell* 184, 1171–1187. e20 (2021).
113. Munnink, B. B. O. et al. Transmission of SARS- CoV-2 on mink farms between humans and mink and back to humans. *Science* 371, 172–177 (2021).
114. Giacomo, S. D., Mercatelli, D., Rakhimov, A. & Giorgi, F. M. Preliminary report on severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS- CoV-2) Spike mutation T478K. *J. Med. Virol.* 93, 5638–5643 (2021).
115. Muecksch, F. et al. Affinity maturation of SARS- CoV-2 neutralizing antibodies confers potency, breadth, and resilience to viral escape mutations. *Immunity* 54, 1853-1868.e7 (2021)
116. Gizinski, Kochanczyk, Grabowski, F., Preibisch, G., S., M. & Lipniacki, T. SARS- CoV-2 variant of concern 202012/01 has about twofold replicative advantage and acquires concerning mutations. *Viruses* 13, 392 (2021).
117. Gottlieb, R. L. et al. Effect of bamlanivimab as monotherapy or in combination with etesevimab on viral load in patients with mild to moderate COVID-19: a randomized clinical trial. *JAMA* 325, 632–644 (2021).
118. Cathcart, A. L. et al. The dual function monoclonal

- antibodies VIR-7831 and VIR-7832 demonstrate potent in vitro and in vivo activity against SARS- CoV-2. Preprint at bioRxiv <https://doi.org/10.1101/2021.03.09.434607> (2021).
119. Greaney, A. J. et al. Antibodies elicited by mRNA-1273 vaccination bind more broadly to the receptor binding domain than do those from SARS- CoV-2 infection. *Sci. Transl Med.* 13, eabi9915 (2021).
  120. Ferreira, I. et al. SARS- CoV-2 B.1.617 mutations L452 and E484Q are not synergistic for antibody evasion. *J. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab368> (2021).
  121. Zhang, L. et al. Comparison of 10 emerging SARS-CoV-2 variants: infectivity, animal tropism, and antibody neutralization. Preprint at Research Square <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-492659/v1> (2021).
  122. Hodcroft, E. B. et al. Spread of a SARS- CoV-2 variant through Europe in the summer of 2020. *Nature* 595, 707–712 (2021).
  123. Choi, B. et al. Persistence and evolution of SARS- CoV-2 in an immunocompromised host. *N. Engl. J. Med.* 383, 2291–2293 (2020).
  124. Kemp, S. A. et al. SARS- CoV-2 evolution during treatment of chronic infection. *Nature* 592, 277–282 (2021).
  125. Avanzato, V. A. et al. Case study: prolonged infectious SARS- CoV-2 shedding from an asymptomatic immunocompromised individual with cancer. *Cell* 183, 1901–1912.e9 (2020).
  126. McCarthy, K. R. et al. Recurrent deletions in the SARS- CoV-2 spike glycoprotein drive antibody escape. *Science* 371, 1139–1142 (2021).
  127. Meng, B. et al. Recurrent emergence of SARS- CoV-2 spike deletion H69/V70 and its role in the alpha variant B.1.1.7. *Cell Rep.* 35, 109292 (2021).
  128. Chi, X. et al. A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the spike protein of SARS- CoV-2. *Science* 369, 650–655 (2020).
  129. Liu, L. et al. Potent neutralizing antibodies against multiple

130. epitopes on SARS- CoV-2 spike. *Nature* 584, 450–456 (2020).
131. Dejnirattisai, W. et al. Antibody evasion by the P.1 strain of SARS- CoV-2. *Cell* 184, 2939–2954 (2021).
132. Hodcroft, E. B. et al. Emergence in late 2020 of multiple lineages of SARS- CoV-2 spike protein variants affecting amino acid position 677. Preprint at bioRxiv <https://doi.org/10.1101/2021.02.12.21251658> (2021)
133. Tablizo, F. A. et al. Genome sequencing and analysis of an emergent SARS- CoV-2 variant characterized by multiple spike protein mutations detected from the Central Visayas Region of the Philippines. Preprint at bioRxiv <https://doi.org/10.1101/2021.03.03.21252812> (2021).
134. Brown, J. C. et al. Increased transmission of SARS- CoV-2 lineage B.1.1.7 (VOC 202012/01) is not accounted for by a replicative advantage in primary airway cells or antibody escape. Preprint at bioRxiv <https://doi.org/10.1101/2021.02.24.432576> (2021).
135. Johnson, B. A. et al. Loss of furin cleavage site attenuates SARS- CoV-2 pathogenesis. *Nature* 591, 293–299 (2021).
136. Saito, A. et al. SARS- CoV-2 spike P681R mutation enhances and accelerates viral fusion. Preprint at bioRxiv <https://doi.org/10.1101/2021.06.17.448820> (2021).
137. Guo, K. et al. Interferon resistance of emerging SARS- CoV-2 variants. Preprint at bioRxiv <https://doi.org/10.1101/2021.03.20.436257> (2021).
138. Thorne, L. G. et al. Evolution of enhanced innate immune evasion by the SARS- CoV-2 B.1.1.7 UK variant. Preprint at bioRxiv <https://doi.org/10.1101/2021.06.06.446826> (2021).
139. Jiang, H. et al. SARS- CoV-2 Orf9b suppresses type I interferon responses by targeting TOM70. *Cell Mol. Immunol.* 17, 998–1000 (2020).
140. Parker, M. D. et al. Altered sub- genomic RNA expression in SARS- CoV-2 B.1.1.7 infections. Preprint at bioRxiv <https://doi.org/10.1101/2021.03.02.433156> (2021).
141. Xia, H. et al. Evasion of type I interferon by SARS- CoV-2.

- Cell Rep. 33, 108234 (2020).
142. Plante, J. A. et al. The variant gambit: COVID-19's next move. *Cell Host Microbe* 29, 508–515 (2021).
  143. Leary, S. et al. Generation of a novel SARS- CoV-2 sub-genomic RNA due to the R203K/G204R variant in nucleocapsid. Preprint at bioRxiv [https://doi.org/ 10.1101/2020.04.10.029454](https://doi.org/10.1101/2020.04.10.029454) (2021).
  144. Kemp SA, Collier DA, Datir RP, Ferreira I, Gayed S, Jahun A, et al. SARS-CoV-2 evolution during treatment of chronic infection. *Nature*. 2021;592(7853):277-82. DOI: 10.1038/s41586-021-03291-y
  145. Creech CB, Walker SC, Samuels RJ. SARS-CoV-2 Vaccines. *Jama*. 2021. DOI: 10.1001/jama.2021.3199
  146. Moore JP. Approaches for Optimal Use of Different COVID-19 Vaccines: Issues of Viral Variants and Vaccine Efficacy. *Jama*. 2021. DOI: 10.1001/jama.2021.3465
  147. 3. Yu, I.T.S. et al. (2004) Evidence of airborne transmission of the severe acute respiratory syndrome virus. *N. Engl. J. Med.* 350, 1731–1739
  148. Otter, J.A. et al. (2016) Transmission of SARS and MERS coronaviruses and influenza virus in healthcare settings: the possible role of dry surface contamination. *J. Hosp. Infect.* 92, 235–250
  149. Li, Y. et al. (2004) Role of air distribution in SARS transmission during the largest nosocomial outbreak in Hong Kong. *Int. J. Indoor Environ. Health* 15, 83–95
  150. Wang, D. et al. (2020) Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA* 323, 1061–1069
  151. Li, Q. et al. (2020) Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 382, 1199–1207
  152. Chan, J.F.W. et al. (2020) A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet* 395, 514–523

153. Ferrett, L. et al. (2020) Quantifying SARS-CoV-2 transmission suggests epidemic control with digital contact tracing. *Science* 368, eabb6936
154. Arons, M.M. et al. (2020) Presymptomatic SARS-CoV-2 infections and transmission in a skilled nursing facility. *N. Engl. J. Med.* 382, 2081–2090
155. Zou, L. et al. (2020) SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *N. Engl. J. Med.* 382, 1177–1179
156. Pan, Y. et al. (2020) Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet Infect. Dis.* 20, 411–412
157. Mizumoto, K. et al. (2020) Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020. *Eurosurveillance* 25, 2000180
158. Meng, Heng et al. (2020) CT imaging and clinical course of asymptomatic cases with COVID-19 pneumonia at admission in Wuhan, China. *J. Infect.* 81, 33–39
159. Rothe, C. et al. (2020) Transmission of 2019-nCoV infection from an asymptomatic contact in Germany. *N. Engl. J. Med.* 382, 970–971
160. He, G. et al. (2020) The clinical feature of silent infections of novel coronavirus infection (COVID-19) in Wenzhou. *J. Med. Virol.* 92, 1761–1763
161. Mukhra, R. et al. (2020) Possible modes of transmission of novel coronavirus SARS-CoV-2: a review. *Acta Biomed* 91, e2020036
162. Tomlinson, B. and Cockram, C. (2003) SARS: experience at Prince of Wales Hospital, Hong Kong. *Lancet* 361, 1486–1487
163. Liu, Y. et al. (2020) Aerodynamic analysis of SARS-CoV-2 in two Wuhan hospitals. *Nature* 582, 557–560
164. Doremalen, N.v. et al. (2020) Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *N. Engl. J. Med.* 382, 1564–1567
165. Ong, S.W.X. et al. (2020) Air, surface environmental, and

- personal protective equipment contamination by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) from a symptomatic patient. *JAMA* 323, 1610–1612
166. Xu, Y. et al. (2020) Characteristics of pediatric SARS-CoV-2 infection and potential evidence for persistent fecal viral shedding. *Nat. Med.* 26, 502–505
  167. Fauver JR, Petrone ME, Hodcroft EB, Shioda K, Ehrlich HY, Watts AG, et al.. Coast-to-coast spread of SARS-CoV-2 in the United States revealed by genomic epidemiology. *medRxiv*. 2020. DOI: 10.1101/2020.03.25.20043828.
  168. Luring AS, Hodcroft EB. Genetic Variants of SARS-CoV-2-What Do They Mean? *Jama*. 2021. DOI: 10.1001/jama.2020.27124.
  169. Wyllie AL, Vogels CBF, Grubaugh ND. Saliva for Detection of SARS-CoV-2. *Reply. N Engl J Med*. 2021;384(9). DOI: 10.1056/NEJMc2032165.
  170. Recommendations for Prevention and Control of Influenza in Children, 2020-2021. *Pediatrics*. 2020. DOI: 10.1542/peds.2020-024588.
  171. Rambaut A, Loman N, Pybus O, Barclay W, Barrett J, al. e. Preliminary genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations.
  172. Bal A, Destras G, Gaymard A, Stefic K, Marlet J, Eymieux S, et al.. Two-step strategy for the identification of SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 and other variants with spike deletion H69-V70, France, August to December 2020.
  173. Hoffmann M, Arora P, Groß R, Seidel A, Hörnich BF, Hahn AS, et al.. SARS-CoV-2 variants B. 1.351 and P.1 escape from neutralizing antibodies. *Cell*. 2021. DOI: 10.1016/j.cell.2021.03.036.
  174. horne, L. G. et al. Evolution of enhanced innate immune evasion by the SARS-CoV-2 B.1.1.7 UK variant. Preprint at *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2021.06.06.446826> (2021)
  175. Jiang, H. et al. SARS-CoV-2 Orf9b suppresses type I interferon responses by targeting TOM70. *Cell Mol. Immunol.* **17**, 998–1000 (2020).
  176. Volz, E. et al. Assessing transmissibility of SARS-CoV-2

- lineage B.1.1.7 in England. *Nature* **593**, 266–269 (2021).
177. Mullen, J. L. et al. *Outbreak.info* <https://outbreak.info/citation> (2020).
178. Leung, K., Shum, M. H., Leung, G. M., Lam, T. T. & Wu, J. T. Early transmissibility assessment of the N501Y mutant strains of SARS-CoV-2 in the United Kingdom, October to November 2020
179. Davies, N. G. et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science* **372**, eabg3055 (2021)
180. Golubchik, T. et al. Early analysis of a potential link between viral load and the N501Y mutation in the SARS-COV-2 spike protein.  
Preprint at *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2021.01.12.20249080> (2021).
181. Kidd, M. et al. S-variant SARS-CoV-2 lineage B1.1.7 is associated with significantly higher viral loads in samples tested by ThermoFisher TaqPath RT-qPCR. *J. Infect. Dis.* **223**, 1666–1670 (2021)
182. Borges, V. et al. Tracking SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 dissemination: insights from nationwide spike gene target failure (SGTF) and spike gene late detection (SGTL) data, Portugal, week 49 2020 to week 3 2021. *Eur. Surveill.* **26**, 2100131 (2021)
183. Grint, D. J. et al. Case fatality risk of the SARS-CoV-2 variant of concern B.1.1.7 in England, 16 November to 5 February. *Eur. Surveill.* **26**, 2100256 (2021)
184. Planas, D. et al. Sensitivity of infectious SARS-CoV-2 B.1.1.7 and B.1.351 variants to neutralizing antibodies. *Nat. Med.* **27**, 917–924 (2021)
185. Edara, V. V., Hudson, W. H., Xie, X., Ahmed, R. & Suthar, M. S. Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 variants after infection and vaccination. *JAMA* **325**, 1896–1898 (2021).
186. Wang, G.-L. et al. Susceptibility of circulating SARS-CoV-2 variants to neutralization. *N. Engl. J. Med.* **384**, 2354–2356 (2021).
187. Graham, M. S. et al. Changes in symptomatology,



- reinfection, and transmissibility associated with the SARS-CoV-2 variant B.1.1.7: an ecological study. *Lancet Public Health* **6**, e335–e345 (2021).
188. Garcia-Beltran, W. F. et al. Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. *Cell* **184**, 2372–2383.e9 (2021).
189. Wall, E. C. et al. Neutralising antibody activity against SARS-CoV-2 VOCs B.1.617.2 and B.1.351, *Lancet* **397**, 2331–2333 (2021)
190. Haas, E. J. et al. Impact and effectiveness of mRNA BNT162b2 vaccine against SARS-CoV-2 infections and COVID-19 cases, hospitalisations, and deaths following a nationwide vaccination campaign in Israel: an observational study using national surveillance data. *Lancet* **397**, 1819–1829 (2021)
191. Abu-Raddad, L. J., Chemaitelly, H. & Butt, A. A. Effectiveness of the BNT162b2 Covid-19 Vaccine against the B.1.1.7 and B.1.351 Variants. *N. Engl. J. Med.* **385**, 187-189 (2021).
192. Heath, P. T. et al. Safety and efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 vaccine, N.Engl. *Med.* <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107659> (2021).
193. Grabowski, F., Preibisch, G., Giziński, S., Kochończyk, M. & Lipniacki, T. SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 has about twofold replicative advantage and acquires concerning mutations. *Viruses* **13**, 392 (2021).
194. Tegally, H. et al. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature* **592**, 438–443 (2021).
195. Shinde, V. et al. Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 vaccine against the B.1.351 variant. *N. Engl. J. Med.* **384**, 1899–1909 (2021).
196. Hoffmann, M. et al. SARS-CoV-2 variants B.1.351 and P.1 escape from neutralizing antibodies. *Cell* **184**, 2384–2393.e12 (2021).
197. Wibmer, C. K. et al. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. *Nat. Med.* **27**, 622–625 (2021).

199. Edara, V. V. et al. Infection- and vaccine-induced antibody binding and neutralization of the B.1.351 SARS-CoV-2 variant. *Cell Host Microbe* **29**, 516–521.e3 (2021).
200. Li, Q. et al. SARS-CoV-2 501Y.V2 variants lack higher infectivity but do have immune escape. *Cell* **184**, 2362–2371.e9 (2021)
201. Moyo-Gwete, T. et al. Cross-reactive neutralizing antibody responses elicited by SARS-CoV-2 501Y.V2 (B.1.351). *N. Engl. J. Med.* **384**, 2161–2163 (2021).
202. Madhi, S. A. et al. Efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 Covid-19 vaccine against the B.1.351 variant. *N. Engl. J. Med.* **384**, 1885–1898 (2021).
203. Faria, N. R. et al. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science* **372**, 815–821 (2021).
204. McCallum, M. et al. N-terminal domain antigenic mapping reveals a site of vulnerability for SARS-CoV-2. *Cell* **184**, 2332–2347.e16 (2021).
205. Dejnirattisai, W. et al. Antibody evasion by the P.1 strain of SARS-CoV-2. *Cell* **184**, 2939–2954 (2021).
206. Liu, C. et al. Reduced neutralization of SARS-CoV-2 B.1.617 by vaccine and convalescent serum. *Cell* **184**, 4220–4336 (2021).
207. Riley, S. et al. REACT-1 round 12 report: resurgence of SARS-CoV-2 infections in England associated with increased frequency of the Delta variant. Preprint
208. at *medRxiv* <https://doi.org/10.1101/2021.06.17.21259103> (2021).
209. Bolze, A. et al. Rapid displacement of SARS-CoV-2 variant B.1.1.7 by B.1.617.2 and P.1 in the United States. Preprint at *medRxiv* <https://doi.org/10.1101/2021.06.20.21259195> (2021).
210. Bernal, J. L. et al. Effectiveness of COVID-19 vaccines against the B.1.617.2 variant. *N. Engl. J. Med.* **385**, 585–594 (2021).
211. Harvey, W. T. et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat. Rev. Microbiol.* **19**, 409–424 (2021).

212. Annavajhala, M. K. et al. A novel SARS-CoV-2 variant of concern, B.1.526, identified in New York. Preprint at *bioRxiv*
213. Zhou, H. et al. B.1.526 SARS-CoV-2 variants identified in new york city are neutralized by vaccine-elicited and therapeutic monoclonal antibodies. *mBio* <https://doi.org/10.1128/mBio.01386-21> (2021).
214. Ozer, E. A. et al. High prevalence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 (UK variant) and the novel B.1.525 lineage in Oyo State, Nigeria. Preprint at *medRxiv* <https://doi.org/10.1101/2021.04.09.21255206> (2021).
215. Zhang, L. et al. Comparison of 10 emerging SARS-CoV-2 variants: infectivity, animal tropism, and antibody neutralization. Preprint at *Research Square* <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-492659/v1> (2021).
216. Bascos, N. A. D., Mirano-Bascos, D. & Saloma, C. P. Structural analysis of spike protein mutations in an emergent SARS-CoV-2 variant from the Philippines. Preprint at *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2021.03.06.434059> (2021).