

# 疫情報導

TAIWAN EPIDEMIOLOGY BULLETIN

2022年8月9日 第38卷 第15期

原著文章

## COVID-19 變異株之實驗室監測

楊季融\*、郭權益、林筠彤、林鈺棋、陳筱蓉、黃湘怡、陳保山、  
謝智存、慕蓉蓉、劉銘燦、李淑英

### 摘要

新型冠狀病毒(SARS-CoV-2)自 2019 年 12 月於中國大陸武漢首度現蹤之後，短時間內已迅速蔓延至全世界其他國家，導致全球大流行疫情。為強化疫情防治效能，即時掌握確診個案之病原體變化情形亟為重要，而基因體序列分析為目前各國所採行的共同策略，除可藉以精準偵測國際關注之特定變異株，釐清病毒流行病學特徵及基因體演化脈絡，作為優化疫苗、藥物及病原體檢測工具等防治措施的科學參考，亦可透過探討不同 SARS-CoV-2 之親緣關係，提高各群聚事件關聯性調查之效率。衛生福利部疾病管制署國家級參考實驗室自全球第一株 SARS-CoV-2 之全基因體序列於國際間正式公布後，已完成建置病毒全基因體定序技術，持續針對國內嚴重特殊傳染性肺炎(COVID-19)確診個案之臨床檢體或其病原體分離株，進行病毒序列分析，結果交由中央流行疫情指揮中心於每日記者會，以公開透明的方式統一對外發布，使國人得以瞭解病毒於國內外流行及變化之最新現況；亦同步提供全國各級衛生單位，據以即時啟動各類疫情防治作為。本文將詳細說明我國於 2020–2022 年間，針對 SARS-CoV-2 變異株之實驗室監測流程及相關分析結果。

**關鍵字：**SARS-CoV-2、COVID-19、基因定序、變異株

### 前言

新型冠狀病毒(SARS-CoV-2)最早的發現起因於 2019 年 12 月於中國湖北省武漢市陸續發現的多起不明原因肺炎群聚感染事件，中國官方後於 2020 年 1 月正式將該病原體的相關資訊對外公佈，也是繼 HCoV-229E、HCoV-NL63、HCoV-HKU1、HCoV-OC43、SARS-CoV 及 MERS-CoV 之後，第 7 種被發現可感染人類

衛生福利部疾病管制署檢驗及疫苗研製中心

通訊作者：楊季融\*

E-mail：ggyang@cdc.gov.tw

投稿日期：2022 年 6 月 14 日

接受日期：2022 年 6 月 14 日

DOI：10.6524/EB.202208\_38(15).0001

的冠狀病毒[1]。在此之後，SARS-CoV-2 在短時間內憑藉有效人傳人的特性，迅速蔓延至全世界其它國家，導致全球大規模疫情。我國為監測與防治此新興傳染病，於 2020 年 1 月 15 日起將 SARS-CoV-2 引起的疾病(COVID-19)公告為「嚴重特殊傳染性肺炎」，列入第五類法定傳染病；世界衛生組織(World Health Organization, WHO)亦於 2020 年 1 月 30 日公布此為一公共衛生緊急事件(Public Health Emergency of International Concern, PHEIC)[2]；後於 3 月 11 日正式宣布疫情進入「全球大流行」階段[3]，呼籲世界各國對於疾病擴散之因應須以強度更高之防治作為進行。根據全球統計資料顯示，截至 2022 年 5 月 17 日止，全球已累計確診約 518,512,130 例，分布於 200 個國家／地區，並造成約 6,279,356 例感染個案死亡；我國同期則累計 896,059 例確診，1,135 例死亡[4]，顯示該病毒具有極高之傳播能力，並已擴散至全球各大洲。

鑒於病毒傳播的速度驚人，有效的疫情控制措施取決於快速發現感染個案，即時隔離阻斷與易感者的後續接觸，進而避免病毒擴散。因此，以快速、靈敏及可靠的方式針對疑似個案檢體檢驗，是疫情爆發後全球共同採行的策略[5]。此外，由於 SARS-CoV-2 屬於 RNA 病毒，病毒複製時可能因自然錯誤產生的基因體突變，改變其特性，包括傳播速度、感染者的疾病嚴重程度以及對於疫苗及治療藥物的感受性等，進而衝擊公共衛生和社會防治措施的有效性[6–10]；亦可能影響核酸檢測工具（例如 PCR）的敏感性與特異性，導致檢驗方法失效而產生異常的檢驗結果[8,11,12]。是故，持續掌握病毒特性，以利即時啟動並適時調整防疫作為，是另一項重要課題，而病毒基因體序列分析為目前世界各國監視 SARS-CoV-2 變化脈絡的主流方式。

隨著病毒持續累積基因體變異，WHO 將帶有特定突變的 SARS-CoV-2 變異株(variant)正式命名，並依據其對於疾病表現與疫情防治措施的影響進行分類，於 2020 年 12 月起陸續定義為「須留意變異株(Variant of Interest, VOI)」以及「須高度關注變異株(Variant of Concern, VOC)」[13]；其他國際組織包括美國疾病控制及預防中心(US Centers for Disease Control and Prevention)及歐洲疾病控制及預防中心(European Centre for Disease Prevention and Control)亦同步公告並據以訂定相關疫情防治政策[14,15]。定義 VOI 的考量因素需同時具備：(1)病毒具有特定突變，且該突變預期或已知可影響其傳播力、疾病嚴重度、免疫反應感受性以及實驗室檢測或藥物之臨床效果；(2)該病毒已在全球多個國家盛行，並造成社區傳播或群聚事件，且疫情規模隨時間持續升高。定義 VOC 的考量因素則為 VOI 中至少須再具備以下任一特性：(1)傳播力增加，或影響病毒流行病學特徵；(2)引起的疾病嚴重度增加，或改變疾病表徵；(3)降低公共衛生或臨床醫療處置措施的效能，包括實驗室診斷、疫苗及藥物治療。截至 2022 年 5 月，WHO 共已定義 5 種 VOC，包括 Alpha、Beta、Gamma、Delta 及 Omicron；與 8 種 VOI，包括 Epsilon、Zeta、Eta、Theta、Iota、Kappa、Lambda 及 Mu。但因這些 SARS-CoV-2 變異株於全球的流行趨勢持續改變，部分 VOC 與 VOI 已不再現蹤，陸續被 WHO 自 VOC 與 VOI

的清單移除，前述各類變異株的詳細資料整理如表一。

衛生福利部疾病管制署（以下簡稱疾管署）檢驗及疫苗研製中心（以下簡稱研檢中心）為我國傳染病檢驗與監測的國家級參考實驗室，自中國首度對外公布全球第一株 SARS-CoV-2 之全基因體序列後，已完成建置病毒基因定序技術，並持續針對 COVID-19 陽性個案之臨床檢體或病毒分離株，剖析基因體特徵。本文將說明 2020–2022 年間，疾管署對於 SARS-CoV-2 之基因序列分析方法及相關監測結果。

表一、世界衛生組織定義之須高度關變異株(Variant of Concern)及須留意變異株(Variant of Interest) (由本研究自行整理)

變異株種類	變異株名稱	PANGO 譜系	重要突變*	最早發現地區	最早被定義日期	自清單移除日期
Previously circulating VOC	Alpha	B.1.1.7	N501Y, D614G, P681H	英國 (2020/9)	2020/12/18	2022/3/9
	Beta	B.1.351	K417N, E484K, N501Y, D614G, A701V	南非 (2020/5)	2020/12/18	2022/3/9
	Gamma	P.1	K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y	巴西 (2020/11)	2021/1/11	2022/3/9
VOC	Delta	B.1.617.2	L452R, T478K, D614G, P681R	印度	2021/5/11	-
	Omicron	B.1.1.529 (包含 BA.1、BA.2、BA.3、BA.4及 BA.5)	A67V, del69-70, T95I, del142-144, Y145D, del211, L212I, ins214EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	南非 (2021/11)	2021/11/26	-
Previously circulating VOI	Epsilon	B.1.427/B.1.429	L452R, D614G	美國 (2020/5)	2021/3/5	2021/6/6
	Zeta	P.2	E484K, D614G	巴西 (2020/4)	2021/3/17	2021/6/6
	Eta	B.1.525	E484K, D614G, Q677H	無特定 (2020/12)	2021/3/17	2021/9/20
	Theta	P.3	E484K, N501Y, D614G, P681H	菲律賓 (2021/1)	2021/3/24	2021/6/6
	Iota	B.1.526	E484K, D614G, A701V	美國	2021/3/24	2021/9/20
	Kappa	B.1.617.1	L452R, E484Q, D614G, P681R	印度	2021/4/4	2021/9/20
	Lambda	C.37	L452Q, F490S, D614G	祕魯	2021/6/14	2022/3/9
Mu	B.1.621	R346K, E484K, N501Y, D614G, P681H	哥倫比亞	2021/8/30	2022/3/9	

\*資料來源：WHO(<https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>)及美國 CDC網站(<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>)資料

#資料來源：ECEC網站(<https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern>)資料

## 材料與方法

### 臨床檢體收集與選取

疾管署針對 SARS-CoV-2 基因定序，係以境外移入、群聚、確診前曾接種疫苗、再感染及經疫調後無法釐清感染源等個案為常規重點監測對象，並持續依國內疫情現況及防疫政策需要滾動調整；針對全國各縣市每日之新增個案，亦以隨機抽樣方式納入分析。此外，亦即時配合指揮中心政策強化特定對象之實施方式，例如自 2021 年 7 月 2 日起，為加強國際港埠入境人員健康監測，針對所有入境旅客且檢驗為陽性者，曾全面進行病毒基因定序；8 月 23 日起因應全球 Delta 變異株日益擴散且具強傳播力，且我國境外移入病例有增加趨勢，為降低病毒進入國內社區風險，並及時偵測國內病例阻斷傳播鏈，針對 SARS-CoV-2 的基因序列分析再次加強監測。前述監測的檢體來源為全國「嚴重特殊傳染性肺炎指定

檢驗機構網絡」之例行檢驗陽性驗餘檢體，該網絡截至 2022 年 5 月 13 日，共計 253 家嚴重特殊傳染性肺炎指定檢驗機構，包含北部 110 家、中部 45 家、南部 77 家、東部 14 家及離島地區 7 家指定檢驗機構。前述驗餘檢體後送至疾管署研檢中心時，須以符合生物安全相關規定之 P650 包裝模式，於低溫（冷凍或冷藏）的環境進行。送抵後經檢體核對分裝、病毒培養（視需要進行）、核酸萃取、聚合酶連鎖反應、核酸定序、基因序列組裝及序列比對等程序，完成病毒序列分析。

### SARS-CoV-2 之實驗室分子生物學確認檢驗

目前我國針對 SARS-CoV-2 病毒之實驗室分子生物學確認檢驗，係以即時螢光聚合酶連鎖反應(real-time RT-PCR)，針對疑似個案之鼻咽（或咽喉）拭子、痰液或其他下呼吸道檢體，檢測病毒基因；此檢驗技術及使用檢體種類亦被世界各國廣泛採用。在檢測方法上，全國各指定檢驗機構須使用經由我國食品藥物管理署（食藥署）核發緊急授權許可(Emergency Use Authorization, EUA)之檢測試劑套組，這些檢驗試劑套組所偵測之病毒基因體標的多元，包括 E、N、RdRp、ORF1ab 及 S 等，各檢驗單位可依人力、設施空間及檢驗量能需求等因素，選擇最適平台導入常規檢驗，例如大型自動化(Automated high-throughput)或診間檢驗(Point-of-Care Testing)等設備。檢驗結果之判讀須依各試劑核准之仿單內容進行。

### SARS-CoV-2 病毒株之分離與鑑定

SARS-CoV-2 之分離與鑑定係將經核酸檢測確認為陽性之臨床樣本，包含深喉唾液、鼻咽拭子及痰液等，將其吸附至 Vero-E6 細胞表面，使 SARS-CoV-2 感染細胞，並於細胞內增殖放大。首先將陽性檢體加入貼附 Vero-E6 細胞之 T25 培養皿，使其於 36°C 且具有 5%CO<sub>2</sub> 的環境下靜置 60 分鐘，期間每隔 15 分鐘搖晃培養皿一次，使病毒可均勻感染細胞，最後將檢體移除後加入含有 2%胎牛血清之 DMEM 培養液，於相同環境培養 7 至 14 天。陽性檢體內的病毒感染細胞後，細胞將逐漸產生病變(cytopathic effect, CPE)，當觀察其發生程度累積至所有細胞的 50% 以上時，收取培養液，最後依前述 SARS-CoV-2 之實驗室分子生物學確認檢驗程序，進行病毒鑑定。

### SARS-CoV-2 之基因體序列分析

SARS-CoV-2 之基因體序列分析係採用桑格法(Sanger method)或次世代定序法(Next-Generation Sequencing, NGS)進行，前者主要分析病毒完整的 S 基因片段，可於短時間內快速且大量針對病毒型別進行定性分析（例如變異株型別鑑定）；後者主要藉由全面分析病毒之完整基因體序列，協助進行疫情關聯性調（例如利用各確診個案及其接觸者的基因定序結果比對，推論可能的感染源）。完整之實驗實施步驟包含病毒核酸萃取、病毒基因體片段放大增殖、定序儀分析、序列組裝與比對等，分述如下：

## 病毒核酸萃取

病毒核酸萃取係使用自動化系統 TANBead OptiPure Viral Auto Tube (Taiwan Advanced Nanotech) 或以手動方法使用 QIAamp Viral RNA kit(QIAGEN company)進行。前者主要應用於患者之呼吸道樣本；後者則應用於萃取經由細胞培養增殖後的病毒培養液為主。操作步驟均依各試劑的原廠說明書建議流程，前者取 300  $\mu\text{l}$ ，後者取 140  $\mu\text{l}$  的樣本，萃取後的核酸(RNA)體積約為 80  $\mu\text{l}$ ；剩餘檢體或病毒液將置於-80°C 冰箱保存。

## 病毒基因體片段放大增殖

桑格定序所需 SARS-CoV-2 基因體片段放大增殖採用傳統聚合酶鏈鎖反應 (Conventional RT-PCR)，試劑使用 QIAGEN OneStep RT-PCR Kit(QIAGEN company)，配方依照原廠建議並作些許調整。內容物包括：RNase-free 純水 13  $\mu\text{l}$ 、正反向專一性引子各 1.0  $\mu\text{l}$ 、dNTP 混合物(10 mM) 1.0  $\mu\text{l}$ 、QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix 1.0  $\mu\text{l}$ 、5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer 5.0  $\mu\text{l}$ 、RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor(Invitrogen company) 0.08  $\mu\text{l}$  以及病毒 RNA 模板 5  $\mu\text{l}$ ，反應總體積為 25  $\mu\text{l}$ 。反應條件為 50°C 30 分鐘（反轉錄反應），95°C 30 分鐘（聚合酶活化反應）。再以 94°C 30 秒、50°C 30 秒、72°C 2 分鐘重複進行 40 個循環，最後進行 72°C 10 分鐘（PCR 產物延伸反應）。反應結束後，以洋菜膠電泳進行 DNA 產物分析。次世代定序使用 COVIDseq 試劑 (Illumina company)進行新冠病毒基因建庫，工作原理先將待定序之 DNA 打散成碎片，其後將各 DNA 碎片擴增，操作依試劑原廠說明書的建議流程進行。

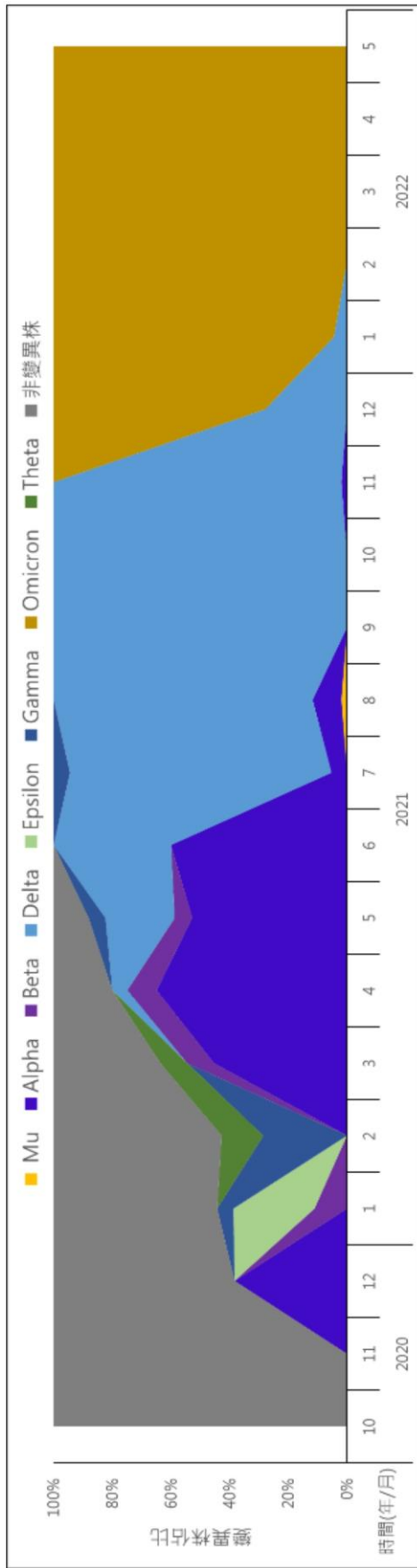
## 定序儀分析、序列組裝與比對

桑格定序以 3730 DNA 自動定序儀(Thermo Fisher company)進行，上機前須經由核酸純化、DNA 濃度測定、螢光標定及二次純化等步驟，所有程序均依試劑的原廠說明書建議流程操作。次世代定序製備完成之基因庫以 iSeq 100 定序儀(Illumina company)進行 DNA 定序反應，大量產生序列資料。由桑格定序法得到的 DNA 序列，最後經序列組裝及比對程序，進行病毒變異株及親緣性等相關分析。次世代定序完成之原始資料將上傳至 BaseSpace 雲端伺服器，續以 DRAGEN COVID Lineage 軟體進行序列組裝及分析。

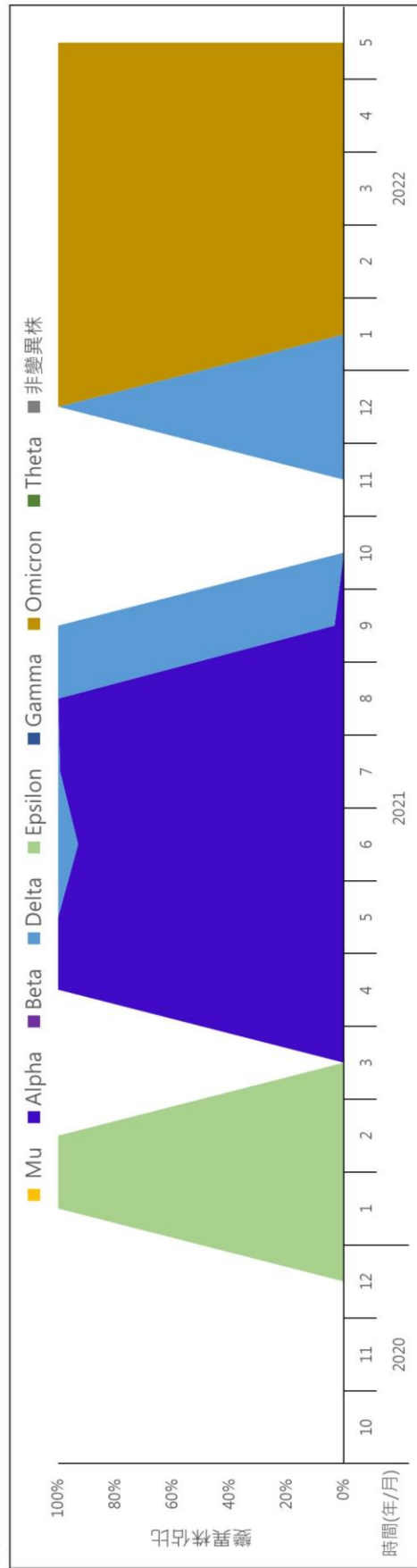
## 結果

自 2020 年 10 月至 2022 年 5 月共 20 個月間，疾管署研檢中心針對我國境外移入及本土之 COVID-19 確診個案臨床檢體或其病毒分離株，總計抽樣分析 3,342 株 SARS-CoV-2 之 S 基因或全基因序列，各病毒之定序結果依不同變異株的基因體特徵進行型別比對後，趨勢分析如圖一。在 VOC 或曾被定義為 VOC 之變異株部分，共檢出 Alpha 變異株 655 株，其中 612 株來自本土個案，43 株來自境外個案（14 國）；Beta 變異株 6 株，皆來自於境外個案（4 國）；Gamma 變異株 6 株，

(A) 境外移入個案



(B) 本土個案



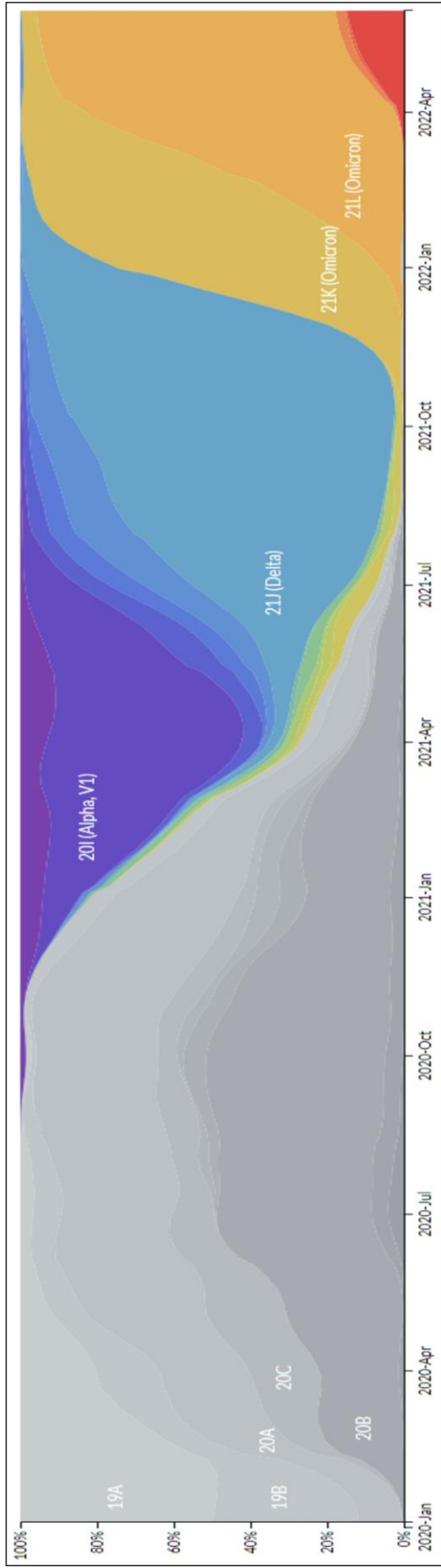
圖一、2020年10月至2022年6月臺灣境外移入及本土 COVID-19 個案病毒變異株趨勢圖

皆來自於境外個案（4 國）；Delta 變異株 318 株，其中 52 株來自本土個案，266 株來自境外個案（53 國）；Omicron 變異株 2292 株，其中 1190 株來自本土個案，1102 株來自境外個案（74 國）。在曾被定義為 VOI 之變異株部分，共檢出 Theta 變異株 2 株，皆來自於境外個案（菲律賓）；Epsilon 變異株 19 株，其中 14 株來自本土個案，5 株來自境外個案（美國）；Mu 變異株 1 株，來自境外個案（美國）。除了上述變異株外，另有 43 株經比對非屬 WHO 所定義之 VOC 或 VOI，列為非變異株，皆來自境外移入個案（13 國）。

上述變異株中，由境外移入 COVID-19 陽性個案發現之種類較為多元，總計 8 種，依時間分析，2020 年 10 月至 2021 年 2 月以非變異株的佔比最高，2021 年 3 至 6 月間 Alpha 變異株成為主流病毒，隨後被 Delta 病毒取代，於 2021 年 7 至 11 月間具流行優勢；此樣態至 2021 年 12 月再次被 Omicron 變異株扭轉成為主流，截至 2022 年 5 月趨勢仍未改變。由本土個案發現之變異株較為單純，總計 4 種，Epsilon 變異株於 2021 年 1 至 2 月間零星檢出，與特定群聚事件有關；Alpha 變異株於 2021 年 4 至 8 月間持續於國內社區檢出，與大規模的本土流行有關；Delta 變異株後於 2021 年 6、7、9 及 12 月於特定群聚事件檢出，2022 年 1 月起新一波本土疫情再由 Omicron 變異株引爆。整體來看，各變異株於境外移入個案發現的時間皆比本土個案早，符合本土疫情係由境外病毒引入社區後伺機引爆的推論。

## 討論

SARS-CoV-2 自 2019 年底首度於中國造成人類感染的案例後，以極為優異的傳播及免疫躲避能力，在世界各國的人群中快速傳播。依據 WHO 針對全球 6 大地理區的統計資料顯示，在感染人數以多次起伏的趨勢持續增加的過程中，雖不同區域的疫情走勢與高峰期不盡相同，截至 2022 年 5 月，全球的 COVID-19 整體疫情趨勢大致可觀察到 4 個較為明顯的流行波段[16]，其中前三波的高峰分別約在 2020 年 12 月至 2021 年 1 月（第 1 波）、2021 年 4 月（第 2 波）以及 2021 年 8 月（第 3 波）；第 4 波的規模明顯較前三波為大，高峰落在 2022 年 1 月。若將此流行趨勢進一步整合由 Nextstrain 網站(Hadfield et al. Bioinformatics)分析全球共享流感數據倡議組織(GISAID)提供之世界各國 SARS-CoV-2 流行株的基因序列資料，進行變異株型別鑑定後的結果顯示（圖二），前述第 1 波疫情的主流病毒為早期的非變異株；第 2 波以 Alpha 變異株為主流；第 3 波的主流轉變為 Delta 變異株；第 4 波則又改由 Omicron 變異株取代。這個趨勢代表隨著病毒持續演化進而累積基因體變異，不同 SARS-CoV-2 憑藉各自具有的特性，不斷於病毒族群中競爭，而對於環境適應性較具優勢者（例如突變有助於躲避宿主免疫毒殺或可使自身傳播力提高等）將成為階段主流。值得注意的是，我國境外移入確診者病毒變異株分析結果（圖一 A）與此國際趨勢相似，顯示藉由境外移入陽性個案之病毒基因序列分析，可有效推估其於全球的流行趨勢。



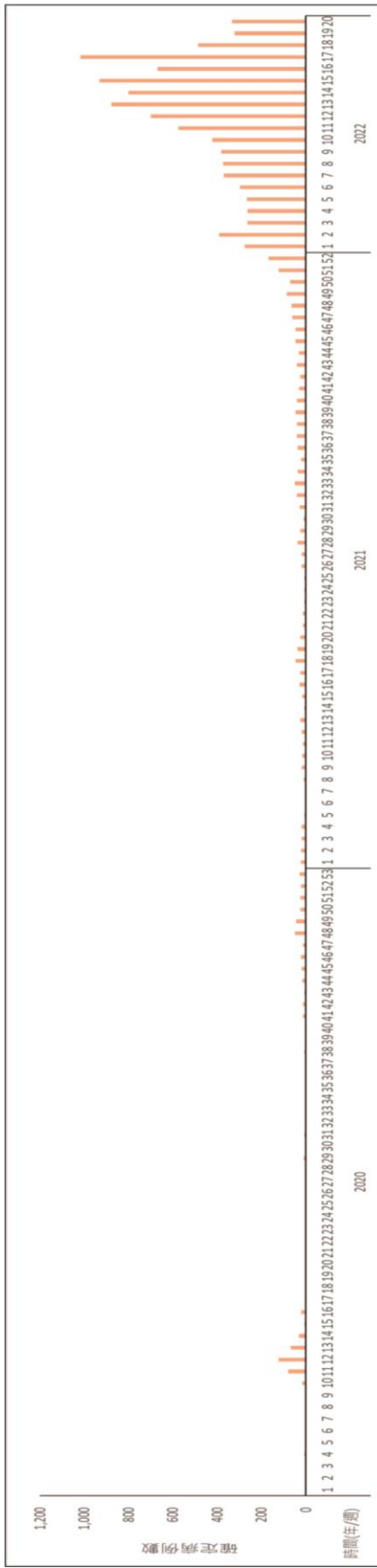
圖二、全球 SARS-CoV-2 病毒變異株流行趨勢 (圖片剪輯自 Nextstrain 網站, <https://nextstrain.org/ncov/gisaid/global/all-time>)

若由國內的 SARS-CoV-2 流行趨勢來看, 依據疾管署針對我國 COVID-19 確診個案的統計資料顯示 (圖三), 自 2020 年 1 月起, 本土個案的聚集大致可分為 2 個較為明顯的流行波段。第 1 波開始於 2021 年 16 週, 於第 20 週出現疫情高峰, 緩解於第 43 週; 第 2 波則開始於 2021 年第 49 週, 於 2022 年第 3 週出現第一個高峰後, 疫情規模快速上升, 至第 20 週為止仍處於高原期的流行階段。此流行趨勢若整合本研究分析之病毒基因序列鑑定結果 (圖一), 第一波的主流病毒為 Alpha 變異株, 第二波則為 Omicron 變異株, 值得注意的是, 雖 Delta 變異株曾於國際間造成大規模的第 3 波疫情, 但在我國並未發生明顯的社區傳播。

SARS-CoV-2 基因定序所得之變異株型別鑑定及親緣性比對結果, 於過去兩年國內發生重大疫情時, 已被證實可作為傳統疫情調查以外的科學證據, 使中央及地方政府防疫相關人員可以更精準的方式抽絲剝繭, 釐清案件關聯, 即時阻斷病毒傳播。疾管署研檢中心將藉此分析技術持續監測國內外 SARS-CoV-2 的變化脈絡, 對於各類病毒可能帶來的風險適時提出警訊, 以利防疫單位進行最有效的因應。



(A) 境外移入個案



(B) 本土個案

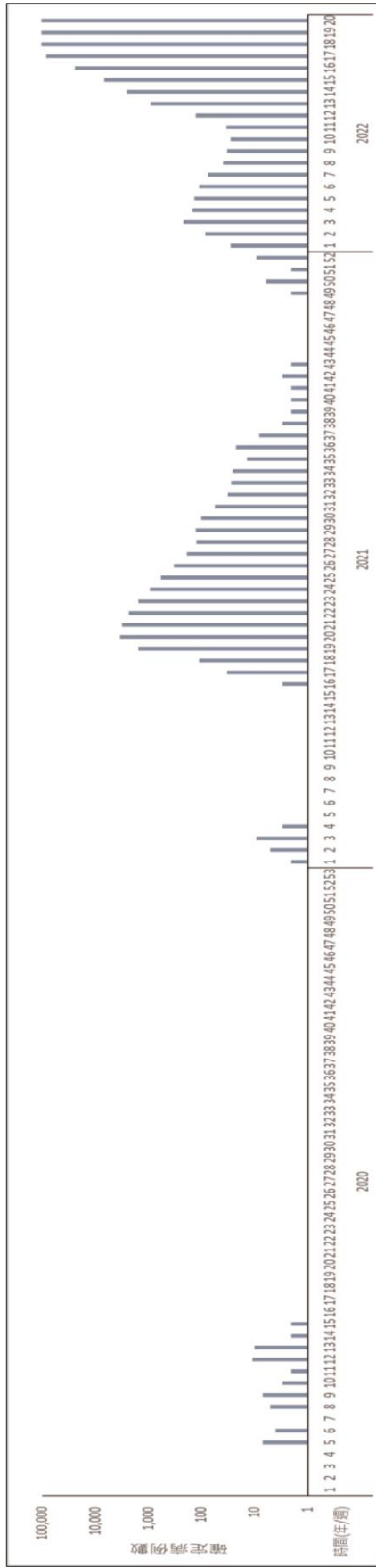


圖3、2020年至2022年6月臺灣境外移入及本土COVID-19陽性個案趨勢圖（資料來源：疾管署傳染病統計資料查詢系統，趨勢圖由本研究自行繪製）

## 誌謝

本研究感謝全國各嚴重特殊傳染性肺炎指定檢驗機構之卓越貢獻，除協助 COVID-19 疑似個案之在地檢驗，亦即時將陽性驗餘檢體後送疾管署研檢中心進行基因定序。

## 參考文獻

1. Loeffelholz MJ, Tang YW. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections - the state of the art. *Emerg Microbes Infect* 2020; 9: 747–56.
2. WHO. COVID-19 Public Health Emergency of International Concern (PHEIC) Global research and innovation forum. Available at: [https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-public-health-emergency-of-international-concern-\(pheic\)-global-research-and-innovation-forum](https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-public-health-emergency-of-international-concern-(pheic)-global-research-and-innovation-forum).
3. WHO. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. Available at: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19--11-march-2020>.
4. 衛生福利部疾病管制署：COVID-19 國內通報統計。 <https://sites.google.com/cdc.gov.tw/2019ncov/taiwan>。
5. Yüce M, Filiztekin E, Özkaya KG. COVID-19 diagnosis -A review of current methods. *Biosens Bioelectron* 2021; 172: 112752.
6. Emary KRW, Golubchik T, Aley PK, et al. Efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine against SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 (B.1.1.7): an exploratory analysis of a randomised controlled trial. *Lancet* 2021; 397: 1351–62.
7. WHO. The effects of virus variants on COVID-19 vaccines. Available at: <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/the-effects-of-virus-variants-on-covid-19-vaccines>.
8. WHO. Weekly epidemiological update on COVID-19 - 23 March 2021. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---23-march-2021>.
9. Garcia-Beltran WF, Lam EC, St Denis K, et al. Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. *medRxiv* 2021; doi:10.1101/2021.02.14.21251704.
10. Harvey WT, Carabelli AM, Jackson B, et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat Rev Microbiol* 2021; 19: 409–24.
11. Lesbon JCC, Poleti MD, de Mattos Oliveira EC, et al. Nucleocapsid (N) Gene Mutations of SARS-CoV-2 Can Affect Real-Time RT-PCR Diagnostic and Impact False-Negative Results. *Viruses* 2021; 13: 2474.

12. USFDA. SARS-CoV-2 Viral Mutations: Impact on COVID-19 Tests. Available at: <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-covid-19-and-medical-devices/sars-cov-2-viral-mutations-impact-covid-19-tests>.
13. WHO. Tracking SARS-CoV-2 variants. Available at: <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>.
14. CDC. SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>.
15. ECDC. SARS-CoV-2 variants of concern as of 12 May 2022. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern>.
16. WHO. Weekly epidemiological update on COVID-19 - 25 May 2022. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---25-may-2022>.