

De opkomst van variants of concern van SARS-CoV-2

Erik Erik Vogelzang^{1,2}, Bettie Voordouw^{1*}, Jacco Wallinga¹, Don Klinkenberg¹, Dirk Eggink^{1,2},
Harry Vennema¹, Chantal Reusken¹

¹WHO COVID-19 referentie laboratorium, Centrum voor Infectieziekten bestrijding, RIVM

²Medische Microbiologie en Infectiepreventie, Amsterdam UMC, locatie AMC.

*Correspondentie: bettie.voordouw@rivm.nl. Inzenddatum: 3 feb 2021

Samenvatting

RNA-virussen zoals SARS-CoV-2 muteren voortdurend tijdens de vermenigvuldiging van het virale genoom door een gebrekkige *proofreading*-capaciteit. Daarnaast zullen er door de langdurige doorgaande circulatie van het virus in de mens en de op dit moment continue veranderende selectiedruk op het virus in toenemende mate varianten verschijnen. Mutaties in functionele domeinen van het virus kunnen leiden tot virusvarianten die geïntensiveerd onderzoek naar de mogelijk consequenties hiervan noodzakelijk maken. Om de verspreiding van deze varianten nauwgezet te volgen is hiervoor een adequate kiemsurveillance noodzakelijk. Wereldwijd zijn al diverse variants of concern (VOC) gedetecteerd. In december 2020 werd zowel in het Verenigd Koninkrijk (VK) als in Zuid-Afrika melding gemaakt van nieuwe varianten (resp. VOC202012/01 en 501 Y.V2). In januari 2021 werden nieuwe varianten in Brazilië gedetecteerd (20J/501Y.V3, B.1.1.28.p1 en 20B/S.484k, B.1.1.28.p2). Binnen Nederland werden deze varianten in een vroeg stadium van de verspreiding via de nationale SARS-CoV-2-kiemsurveillance of het sequencen van SARS-CoV-2 bij reizigers met een zekere reishistorie opgemerkt. De toename in de prevalentie van de VOC202012/01 in de aselechte steekproeven in de surveillance wordt gebruikt om het verloop van de SARS-CoV-2-epidemie in Nederland te modelleren voor beleid. Verder onderzoek en surveillance zullen moeten laten zien wat de eventuele klinische en epidemiologische gevolgen zijn van deze en mogelijke toekomstige varianten, zowel in Nederland als mondiaal.

Introductie

Eind december 2019 werd voor het eerst melding gemaakt van een uitbraak met het severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in Wuhan, China. Hierop volgde

wereldwijd de snelle verspreiding van SARS-CoV-2 waarbij de eerste melding van een casus in Nederland op 27 februari 2020 plaatsvond. RNA-virussen zoals SARS-CoV-2 muteren voortdurend tijdens de vermenigvuldiging van het virale genoom door een gebrekkige *proofreading*-capaciteit. Hierdoor ontstaan en circuleren er vele varianten van SARS-CoV-2.[1] Door de langdurige doorgaande circulatie van het virus in de mens en de op dit moment continue veranderende selectiedruk op het virus, bijvoorbeeld door anthropozoönotische spill-over en een toenemende inzet van vaccins en therapieën, zullen er steeds meer variaties opduiken die het virus een fenotypisch voordeel geven maar mogelijk voor de mens nadelig zijn.

Een van de eiwitten van het virus die nauwlettend gevolgd worden voor het optreden van functionele mutaties is het zogeheten spike-eiwit (S). Met dit eiwit hechten de virusdeeltjes zich aan het celoppervlak; ze zijn daarmee essentieel voor het virus om cellen te infecteren. Veranderingen in het spike-eiwit kunnen infectiviteit of besmettelijkheid van het virus mogelijk veranderen. Bovendien is tegen het spike-eiwit een groot deel van onze specifieke (neutraliserende) afweer gericht. Eén van de eerste mutaties die wereldwijd de overhand kreeg is de spike eiwit D614G mutatie, die mogelijk een verhoogde kans op transmissie geeft.[2]

Sindsdien is de genetische diversiteit van het virus gradueel toegenomen, inclusief mutaties in het spike-eiwit. Deze diversificatie heeft geleid tot een groot aantal verschillende genetische varianten, ook wel lineages of clades genaamd. Sommige van deze varianten bevatten mutaties in domeinen waarvan we weten dat deze belangrijk zijn voor besmettelijkheid en/of immuniteit.

Schattingen laten zien dat de mutatiesnelheid in het genoom van SARS-CoV-2 ongeveer 1 tot 2 mutaties per maand is, laag in vergelijking met andere RNA-virussen.[3] Verschillende mechanismen kunnen ten grondslag liggen aan het versneld ontstaan van nieuwe varianten waaronder de eerder genoemde toegenomen selectiedruk door toepassing van (langdurige) antivirale therapieën en vaccin-geïnduceerde immuniteit. Eerder zijn al hogere mutatiefrequenties van SARS-CoV-2 beschreven bij immuungecompromitteerde patiënten met een chronische SARS-CoV-2-infectie.[4] Daarnaast kunnen nieuwe varianten versneld ontstaan door de infectie bij andere soorten, zoals nertsen of tijgers, en door mutaties in het replicase-enzym die een negatieve invloed hebben op de gebrekkige proofreading. Recent zijn diverse varianten ontstaan met een opvallend aantal mutaties in het spike-eiwit.

In december werd er vanuit het Verenigd Koninkrijk (VK) melding gemaakt van een nieuwe variant, genoemd Variant of Concern, year 2020, month 12, variant 01 (VOC202012/01, B.1.1.7, 501Y.V1), met negen additionele mutaties in het spike-eiwit.[5] Andere 'variants of concern' zijn recent gedetecteerd in Zuid-Afrika (20J/501Y.V2, B.1.351) en Brazilië (20J/501Y.V3, B.1.1.28.p1 en 20B/S.484k, B.1.1.28.p2).[6]

Het ontstaan en de verspreiding van de verschillende varianten met mutaties in functionele domeinen van het virus leidt tot geïntensiveerd onderzoek naar de mogelijke consequenties hiervan voor klinisch beloop, diagnostiek en effectiviteit van de gebruikte vaccins.

Epidemiologie en kiemsurveillance

In december liet epidemiologisch onderzoek in Zuidoost-Engeland een onverwachte toename zien van het aantal SARS-CoV-2-infecties. Er was sprake van een verdrievoudiging van het tweewekelijks gerapporteerde aantal infecties. Uit sequencing bleek dat een substantieel deel van SARS-CoV-2 uit deze verheffing tot een nieuw fylogenetische lineage cluster behoorde. Deze variant, VOC202012/01 wordt op 14 december aan de WHO gemeld.[7] Uit retrospectief onderzoek blijkt dat deze variant al voor het eerst in september aanwezig was in monsters van twee casussen in het VK. Na de snelle verspreiding binnen het VK zijn er vanaf eind december ook gevallen gevonden in Europa (onder meer België, Denemarken, Frankrijk, Duitsland, Nederland, Italië, Noorwegen, Portugal, Spanje en Zweden), maar ook mondiaal in onder meer Australië, Canada, Israël, Jordanië en Zuid-Korea.[8]

In november werd bij surveillance in Zuid-Afrika opgemerkt dat in drie provincies een nieuwe SARS-CoV-2-lineage, 501 Y.V2, andere SARS-CoV-2-lineages had verdrongen. Op 18 december 2020 maakten de Zuid-Afrikaanse autoriteiten melding van deze nieuwe variant (501 Y.V2).[9]

Sommige varianten kunnen potentieel zorgen voor een verhoogde kans op transmissie, ernstiger ziektebeloop, een toename van herinfecties en verminderde vaccineffectiviteit. Het tijdig zicht hebben op de aanwezigheid en/of circulatie van specifieke (nieuwe) varianten is dan ook noodzakelijk. Dit gebeurt in Nederland via het nationale kiemsurveillanceprogramma en via sequenzen in specifieke situaties. Deze specifieke situaties kunnen zich bijvoorbeeld voordoen bij bijzondere casuïstiek, in het kader van intramurale infectieziektepreventie, uitbraken met een bijzondere signatuur of binnen bron- en contactopsporing in het geval van bijvoorbeeld een bijzondere reishistorie. De kiemsurveillance is gebaseerd op het sequencen van een aselecte steekproef van positieve casussen verspreid over Nederland. Dit gebeurt in een samenwerkingsverband van een groot aantal laboratoria verspreid over Nederland.

Uit deze kiemsurveillance kwam naar voren dat in Nederland in de laatste twee weken van 2020 en de eerste twee weken van 2021 het aandeel VOC202012/01 in de steekproef toenam van 1,4 naar 19,8 procent. Data uit de kiemsurveillance worden direct gebruikt in modellering van het verloop van de epidemie. Maar ook onder andere met betrekking tot bestrijdingsmaatregelen en de aantallen casussen, aantallen bezette ziekenhuisbedden en

benodigde IC-capaciteit. Uit deze modellering komt naar voren dat de VOC202012/01 zich verspreidt met een reproductiegetal dat 40 tot 45 procent hoger ligt dan bij de andere circulerende lineages in Nederland. Daarnaast is in de kiemsurveillance tot en met week 7 in 69 gevallen de Zuid-Afrika-variant en een van de twee Brazilië-varianten (20J/501Y.V3, B.1.1.28.p1) geïdentificeerd. De VK-variant met E484K-mutatie is eenmaal aangetroffen. De actuele stand van zaken met betrekking tot VOC's is terug te vinden op de website van het RIVM.[10]

Mutaties en gevolgen

In de VOC202012/01 zijn er 14 substituties en drie deleties gevonden waaronder de volgende mutaties in het spike-eiwit; 69-70-deletie, Y144-deletie, N501Y, A570D, P681H, T716I, S982A en D1118H.[11] Wat de gevolgen zijn van deze constellatie aan mutaties voor de eigenschappen van het virus is nog niet geheel duidelijk. De mutatie N501Y beïnvloedt waarschijnlijk de affiniteit voor binding van het virus aan de ACE-2-receptor[12,13] en verondersteld wordt dat deze mutatie, al dan niet in combinatie met de deletie 69-70, de besmettelijkheid van het virus verhoogt. In het rapport op 18 december 2020 van de adviesgroep New and Emerging Respiratory Virus Threats (NERVTAG) van de Britse overheid wordt ervan uitgegaan dat de transmissie 71 procent (95 procent betrouwbaarheidsinterval 67 procent - 75 procent) hoger is dan van de 'klassieke' SARS-CoV-2-varianten zonder de N501Y-mutatie en 69-70-deletie. Verder ligt de geschatte toename van de R-waarde tussen de 0,39 en 0,93.[14]

Het receptorbindingsdomein (RBD) van het spike-eiwit en het n-terminale domein (NTD) zijn twee belangrijke targets voor beschermende antistoffen. Positie 501 is onderdeel van het RBD. Een verandering op deze positie kan dus negatieve gevolgen hebben voor de binding van beschermende (neutraliserende) antistoffen aan de receptor en de bescherming na infectie. De mutatie N501Y lijkt echter geen dramatische invloeden te hebben op de werking van neutraliserende antistoffen.[15-18] Er zijn zeer preliminaire gegevens dat de virale loads bij patiënten geïnfecteerd met VOC202012/01 is toegenomen. Meer onderzoek naar de mate van toename in specifieke cohorten is noodzakelijk.

De Zuid-Afrika-variant is in Nederland tot 1 februari 2021 23 keer aangetroffen; één keer in de aselechte bemonstering van de kiemsurveillance en 23 keer in relatie tot een reisgeschiedenis Zuid-Afrika en hieruit volgend BCO. Naast de mutatie N501Y komt er in deze variant een aantal andere mutaties in het spike-eiwit voor, waaronder K417N en E484K. Net als N501Y wordt de mutatie E484K verondersteld de affiniteit van het spike-eiwit van het virus voor de ACE2-receptor te verhogen. Daarnaast kunnen de mutaties K417N en E484K ook de effectiviteit van neutraliserende antistoffen negatief beïnvloeden, hetgeen

consequenties kan hebben voor de effectiviteit van de op dit moment beschikbare (mRNA en virale vector) vaccins. Daarnaast lijkt deze variant mogelijk verminderd geneutraliseerd wordt door specifieke antistoffen en convalescent plasma van patiënten uit de eerste golf.[19] Moderna heeft een preliminair rapport gepubliceerd waaruit bleek dat het neutraliserend vermogen voor de Zuid-Afrika-variant met een factor 6 is afgenomen.[16] In hoeverre dit daadwerkelijk verminderde bescherming tot gevolg heeft dient nader onderzocht te worden. Preliminare gegevens wijzen eveneens op ongeveer een 50 procent toegenomen besmettelijkheid van deze variant.[20] Ook in Brazilië (Manaus en omstreken en bij vier reizigers naar Japan) is een variant (20J/501Y.V3, B.1.1.28.p1) opgedoken met dit trio aan mutaties in het spike-eiwit, alleen bevindt zich de mutatie op positie K417T.[21] De andere Braziliaanse variant B.1.1.28.p2 heeft van het trio alleen de mutatie E484K.[22] Inmiddels is bekend geworden dat er in het VK VOC202012/01 varianten circuleren die ook de mutatie E484K hebben verworven.[23]

Ziektebeloop

Bij een eerste inschatting van NERVTAG leek het dat er geen aanwijzingen zijn dat de VOC202012/01 vaker leidt tot een ernstiger ziektebeloop. Echter, op 21 januari 2021 wordt in een nieuwe publicatie van NERVTAG gemeld dat een toename in ziekte-ernst en overlijdensrisico bij VOC202012/01 in vergelijking met non- VOC202012/01-varianten toch niet geheel uitgesloten kon worden.[24]

Diagnostiek

De deletie van 69-70 in het S-eiwit van VOC202012/01 beïnvloedt de detectie van SARS-CoV-2-RNA door sommige RT-PCR's die het S-gen als target gebruiken. Aangezien de in Nederland gebruikte diagnostische PCR's vaak gebaseerd zijn op meerdere targets heeft de aanwezigheid van deze deletie geen invloed gehad op de betrouwbaarheid van de huidige diagnostiek. S-gene target failures (SGTF, ook wel s-drop-outs genoemd) wordt in sommige gevallen gebruikt om een inschatting te maken van het voorkomen van de Britse variant. De SGTF geven namelijk inzicht in het voorkomen van varianten met del 69-70, hierbij is sequencen wel noodzakelijk om te zien welk percentage van de SGTF de VK-variant betreft. Naast de VOC202012/01 zijn er andere lineages die circuleren met eenzelfde deletie op positie 69/70. Momenteel is nog onduidelijk wat de gevolgen van de mutaties in het S-eiwit en andere delen van SARS-CoV-2 op de diagnostische accuratesse van serologische en antigeentesten is. Ook voor de Zuid-Afrika-variant en de Braziliaanse variant zal uit verder onderzoek moeten blijken welke invloed de mutaties hebben op het huidige diagnostische arsenaal.

Vaccins

Door de mutaties in het S-eiwit zijn er zorgen omtrent de huidige vaccins. Deze worden op verschillende platforms ontwikkeld, waarbij de basis voor bescherming gericht is op vorming van beschermende antistoffen tegen het spike-eiwit. De nu ontwikkelde en geregistreerde vaccins wekken beschermende antistoffen op tegen de circulerende stammen die bekend waren op het moment van het klinisch onderzoek voor registratie. Zoals hierboven aangegeven, bevatten de huidige VOC's diverse mutaties die de gevoeligheid voor deze beschermende antistoffen mogelijk verlagen.

Op het moment van schrijven zijn er drie vaccins in de EU geregistreerd, het Pfizer/BionTech-vaccin, het Moderna-vaccin en het AstraZeneca-vaccin. De eerste twee zijn gebaseerd op het mRNA-platform, de laatste is gebaseerd op een virale vector. Het principe van mRNA-vaccins is dat het mRNA na injectie codeert voor productie van het hele S-eiwit.[25,26] Beide hebben een kleine modificatie om het S-eiwit (waartegen de antistoffen moeten worden gemaakt door de gastheer) te stabiliseren in de zogeheten 'prefusion'-confirmatie; dit is van belang voor de stabiliteit van de functie van het vaccin.[27] Het derde vaccin is gebaseerd op een recombinant replicatiedeficiënt chimpansee-adenovirus dat ook codeert voor het hele S-eiwit [28], echter zonder de modificatie voor S-eiwitstabilisatie. Sommige virusvarianten lijken geassocieerd met een vermindering van virusneutraliserend vermogen van de door het vaccin opgewekte antistoffen.[16,29] Of dit ook tot een verminderde bescherming leidt, kan hieruit echter niet zondermeer geconcludeerd worden. In de vaccins ontbreken andere viruscomponenten waartegen na natuurlijke infectie antistoffen gevormd kunnen worden. Uit verschillende experimenten blijkt dat mutaties in andere genoomsegmenten van het virus ook kunnen leiden tot een 'virus escape' van neutraliserende antistoffen.[27] Dit impliceert dat ze na infectie ook bijdragen aan de virusherkenning en opbouw van immuniteit. Een verminderde bescherming is echter ook afhankelijk van andere factoren, waaronder de sterkte van de virusneutralisatie na vaccinatie; bij een sterke respons kan een lichte vermindering van neutralisatie ten aanzien van bepaalde varianten een beperkt effect hebben op klinische bescherming en de invloed van de geïnduceerde virusspecifieke cellulaire respons. Wat dit uiteindelijk betekent voor de effectiviteit van het vaccinatieprogramma zal moeten blijken uit klinische studies in geografische gebieden met prevalentie variantcirculatie [29], (internationale) observationele studies of dierproeven. Om de actuele ontwikkelingen bij te houden rond de verschillende vaccins zijn de European Public Assessment Reports (EPAR's) van deze vaccins op website van de EMA interessant om te volgen.[30]

Conclusie

In RNA-virussen zoals SARS-CoV-2 treden voortdurend mutaties op. Mutaties in functionele domeinen van het virus kunnen leiden tot virusvarianten die het noodzakelijk maken om geïntensiveerd onderzoek te doen naar de mogelijke consequenties hiervan, en om de verspreiding van deze varianten nauwgezet te volgen. Om deze varianten te detecteren en de mate van voorkomen te kunnen volgen, is onder andere een adequate kiemsurveillance noodzakelijk. Wereldwijd zijn al meerdere variants of concern gedetecteerd. In december 2020 werd er zowel in het VK als in Zuid-Afrika melding gemaakt van nieuwe varianten (respectievelijk VOC202012/01 en 501 Y.V2). In januari 2021 werden er nieuwe varianten in Brazilië gedetecteerd (20J/501Y.V3, B.1.1.28.p1 en 20B/S.484k, B.1.1.28.p2). Binnen Nederland werden deze varianten in een vroeg stadium van de verspreiding middels de nationale SARS-CoV-2-kiemsurveillance of het sequencen van SARS-CoV-2 bij reizigers met een zekere reishistorie opgemerkt. De toename in de prevalentie van de VOC202012/01 in de aselecte steekproeven in de surveillance wordt gebruikt om het verloop van de SARS-CoV-2-epidemie in Nederland te modelleren ten behoeve van beleid. Verder onderzoek en surveillance zal moeten laten zien wat de eventuele klinische en epidemiologische gevolgen zijn van deze en mogelijke toekomstige varianten, zowel in Nederland als mondiaal. Momenteel wordt de kiemsurveillance samen met laboratoria in Nederland verder vormgegeven.

Referenties

1. Koyama T, Platt D, Parida L. Variant analysis of SARS-CoV-2 genomes. *Bull World Health Organ* 2020;98:495-504. doi:10.2471/BLT.20.253591.
2. Volz E, Hill V, McCrone JT, et al. Evaluating the Effects of SARS-CoV-2 Spike Mutation D614G on Transmissibility and Pathogenicity. *Cell*. 2021;184:64-75.e11. doi:10.1016/j.cell.2020.11.020.
3. Duchene S, Featherstone L, Haritopoulou-Sinanidou M, et al. Temporal signal and the phylodynamic threshold of SARS-CoV-2. *Virus Evol.* 2020;6:veaa061. doi:10.1093/ve/veaa061.
4. Choi B, Choudhary MC, Regan J, et al. Persistence and Evolution of SARS-CoV-2 in an Immunocompromised Host. *N Engl J Med*. 2020;383:2291-3. doi:10.1056/NEJMc2031364.
5. COVID 19 Genomics UK Consortium: COG-UK update on SARS-CoV-2 Spike mutations of special interest Report 1. 2020.
6. ECDC. Risk related to the spread of new SARS-CoV-2 variants of concern in the EU/EEA – first update. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/covid-19->

- risk-assessment-spread-new-variants-concern-eueea-first-update (accessed 1 Feb 2021).
7. World Health Organization. SARS-CoV-2 Variant – United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland. <https://www.who.int/csr/don/21-december-2020-sars-cov2-variant-united-kingdom/en/> (accessed 1 Feb 2020).
 8. ECDC. Risk Assessment: Risk related to spread of new SARS-CoV-2 variants of concern in the EU/EEA. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/covid-19-risk-assessment-spread-new-sars-cov-2-variants-eueea> (accessed 1 Feb 2021).
 9. World Health Organization. SARS-CoV-2 Variants. <https://www.who.int/csr/don/31-december-2020-sars-cov2-variants/en/> (accessed 1 Feb 2021).
 10. RIVM. Varianten van het coronavirus SARS-CoV-2. <https://www.rivm.nl/coronavirus-covid-19/virus/varianten> (accessed 4 Mar 2021).
 11. Rambaut A, Loman N, Pybus O, et al. Preliminary genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations. <https://virological.org/t/preliminary-genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-the-uk-defined-by-a-novel-set-of-spike-mutations/563>. (accessed 1 Feb 2021).
 12. Gu H, Chen Q, Yang G, et al. Adaptation of SARS-CoV-2 in BALB/c mice for testing vaccine efficacy. *Science*. 2020;369:1603-7. doi:10.1126/science.abc4730.
 13. Starr TN, Greaney AJ, Hilton SK, et al. Deep Mutational Scanning of SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain Reveals Constraints on Folding and ACE2 Binding. *Cell*. 2020;182:1295-310.
 14. New and Emerging Respiratory Virus Group Threats Advisory Group. NERVTAG meeting on SARS-CoV-2 variant under investigation VUI-202012/01. <https://khub.net/documents/135939561/338928724/SARS-CoV-2+variant+under+investigation+procent2C+meeting+minutes.pdf/962e866b-161f-2fd5-1030-32b6ab467896?t=1608470511452> (accessed 1 Feb 2020).
 15. Rathnasinghe R, Jangra S, Cupic A, et al. The N501Y mutation in SARS-CoV-2 spike leads to morbidity in obese and aged mice and is neutralized by convalescent and post-vaccination human sera. *medRxiv* 2021;2021.01.19.21249592.
 16. Wu K, Werner AP, Moliva JI, et al. mRNA-1273 vaccine induces neutralizing antibodies against spike mutants from global SARS-CoV-2 variants. *bioRxiv* 2021;2021.01.25.427948.
 17. Krammer F, Srivastava K, Simon V. Robust spike antibody responses and increased reactogenicity in seropositive individuals after a single dose of SARS-CoV-2 mRNA vaccine. *medRxiv* 2021;2021.01.29.21250653.
 18. Wang Z, Schmidt F, Weisblum Y, et al. mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-

- CoV-2 and circulating variants. *bioRxiv Prepr Serv Biol.* 2021.
doi:10.1101/2021.01.15.426911.
19. Wibmer CK, Ayres F, Hermanus T, et al. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. *bioRxiv* 2021;2021.01.18.427166.
 20. Carl AB Pearson, Timothy W Russell, Nicholas G Davies, Adam J Kucharski, CMMID COVID-19 working group, W John Edmunds RME. Estimates of severity and transmissibility of novel SARS-CoV-2 variant 501Y.V2 in South Africa. <https://cmmid.github.io/topics/covid19/sa-novel-variant.html> (accessed 1 Feb 2021).
 21. Faria NR, Claro IM, CD et al. Genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in Manaus: preliminary findings. *Virological*. <https://virological.org/t/genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-manaus-preliminary-findings/586> (accessed 1 Feb 2021).
 22. Voloch CM, da Silva FR, de Almeida LGP, et al. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2 lineage from Rio de Janeiro, Brazil. *medRxiv* 2020;2020.12.23.20248598.
 23. Phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 clusters in their international context - cluster S.E484. https://nextstrain.org/groups/neherlab/ncov/S.E484?c=gt-S_484,501,570&label=clade:20I/501Y.V1&m=div (accessed 1 Feb 2021).
 24. New and Emerging Respiratory Virus Group Threats Advisory Group. NERVTAG note on B.1.1.7 severity. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/955239/NERVTAG_paper_on_variant_of_concern__VOC__B.1.1.7.pdf (accessed 1 Feb 2021).
 25. European Medicines Agency. Assessment report COVID-19 mRNA vaccine (nucleoside-modified). https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf (accessed 1 Feb 2021).
 26. European Medicines Agency. Assessment report COVID-19 Vaccine Moderna. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/covid-19-vaccine-moderna-epar-public-assessment-report_en.pdf (accessed 1 Feb 2021).
 27. Xia X. Domains and Functions of Spike Protein in Sars-Cov-2 in the Context of Vaccine Design. *Viruses*. 2021;13. doi:10.3390/v13010109.
 28. European Medicines Agency. EMA recommends COVID-19 Vaccine AstraZeneca for authorisation in the EU. <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-recommends-covid-19-vaccine-astrazeneca-authorisation-eu> (accessed 1 Feb 2021).
 29. Moore JP, Offit PA. SARS-CoV-2 Vaccines and the Growing Threat of Viral Variants. *JAMA* Published Online First: 28 January 2021. doi:10.1001/jama.2021.1114

30. European Medicines Agency. Human medicine European public assessment report (EPAR). https://www.ema.europa.eu/en/medicines/field_ema_web_categories_procent253Aname_field/Human/ema_group_types/ema_medicine (accessed 1 Feb 2021).