

IDENTIFICATION DES VARIANTS DU SARS-COV-2 EN CÔTE D'IVOIRE, ÉTUDE COMPARATIVE DE LA MÉTHODE DE CRIBLAGE PAR RT-QPCR TEMPS RÉEL ET LE SÉQUENÇAGE NGS (MINION MK 1C)

IDENTIFICATION OF SARS-COV-2 VARIANTS IN CÔTE D'IVOIRE, COMPARATIVE STUDY OF THE SCREENING METHOD BY REAL-TIME RT-QPCR AND NGS SEQUENCING (MINION MK 1C)

HERVÉ A. KADJO¹, YAKOURA KARIDJA OUATTARA¹, KOUAKOU VENANCE¹, SYLLA ABOUBACAR², ADAGBA MARIUS¹, EDGARD ADJOGOUA¹, MIREILLE DOSSO³

RÉSUMÉ

L'émergence continue de nouveaux variants du SARS-CoV-2 exige des méthodes de diagnostic rapides fiables et moins coûteuses pour la détection précoce des variants circulants du SARS-CoV-2, en particulier dans les pays à faibles ressources où le séquençage du génome entier n'est pas disponible. L'objectif de cette étude était de comparer deux techniques d'identification des variants du SARS-CoV-2. Un total, de 257 échantillons positifs au SARS-CoV-2 ont été collectés entre les mois de Mars et d'octobre 2022. Les échantillons ont été successivement testés par une technique de criblage par qRT-PCR et par le séquençage utilisant la Technologie des Nanopores d'Oxford (ONT). Sur l'ensemble des 257 échantillons analysés, 64,98% (167/257) des mutations ont été détectés par le test de criblage par qRT-PCR permettant l'identification des variants Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351),

Delta (B.1.617.2), Gamma (P.1), Lambda (C.37), Eta (B.1.525), Omicron (B.1.1.529) et Autres Omicron différents de la lignée (B.1.1.529). Le séquençage a permis de détecter des mutations conduisant à l'identification des variants chez 97,66% (251/257) des échantillons analysés. Tous les variants détectés par le kit de criblage ont été confirmés par le séquençage. Cependant des clades ou lignées du variant omicron n'ont pas été détecté par le Kit de criblage. Le criblage par qRT-PCR peut être une méthode alternative à l'identification des variants circulant de SARS-CoV-2. Cependant l'adaptation des kits d'identification des variants par qRT-PCR devra suivre l'évolution perpétuelle du virus ; surtout pour l'identification des variants avec un intérêt clinico-épidémiologique avéré.

MOTS-CLÉ : SARS; COV-2; VARIANTS; CRIBLAGE; SÉQUENÇAGE

ABSTRACT

The continuous emergence of new SARS-CoV-2 variants requires reliable and cost-effective rapid diagnostic methods for the early detection of circulating SARS-CoV-2 variants, particularly in low-resource settings where whole genome sequencing is not available. The objective of this study was to compare two techniques for the identification of SARS-CoV-2 variants. A total of 257 SARS-CoV-2 positive samples were collected between March and October 2022. The samples were successively tested by qRT-PCR screening technique and by sequencing using Oxford Nanopore Technology (ONT). Of the 257 samples analyzed, 64.98% (167/257) of mutations were detected by the qRT-PCR screening test allowing the identification of the Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Delta (B.1.617.2), Gamma (P.1), Lambda

(C.37), Eta (B.1.525), Omicron (B.1.1.529) and Other Omicron variants different from the lineage (B.1.1.529). Sequencing detected mutations leading to the identification of variants in 97.66% (251/257) of the samples analyzed. All variants detected by the screening kit were confirmed by sequencing. However, clades or lineages of the omicron variant were not detected by the screening kit. qRT-PCR screening can be an alternative method for identifying circulating SARS-CoV-2 variants. However, the adaptation of qRT-PCR variant identification kits will have to follow the perpetual evolution of the virus; especially for the identification of variants with proven clinical-epidemiological interest.

KEYWORDS: SARS; COV-2; VARIANTS; SCREENING; SEQUENCING

1- Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Département des Virus Épidémiques

2- Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Plateforme de biologie moléculaire

3- Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Département de Bactériologie, Virologie

Auteur correspondant : Hervé A KADJO ; rvkdjo@yahoo.fr

INTRODUCTION

En décembre 2019, les premiers cas d'une nouvelle maladie respiratoire grave ont été détectés à Wuhan, en Chine. Le nouveau β -coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère 2 (SRAS-CoV-2) a été identifié comme étant la cause de la maladie à coronavirus 2019 (COVID-19) (Zhu *et al.*, 2020). A l'instar d'autres virus à ARN, l'un des défis posés par le SRAS-CoV-2 est représenté par la variabilité génomique, qui peut conduire à l'émergence de variantes présentant une meilleure transmissibilité, une virulence accrue et/ou une capacité à échapper au système immunitaire. Bien que le séquençage de l'ensemble du génome viral représente l'approche de référence pour l'identification des variants, il est coûteux, long, prend du temps et nécessite des laboratoires spécialisés. Depuis le début de la pandémie, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a recommandé RT-qPCR comme

technique de référence pour la détection moléculaire du SARS-CoV-2 (Azzi *et al.*, 2020 ; Rao *et al.*, 2021). Cependant, avec la propagation rapide de l'infection, des mutations dans ces régions cibles spécifiques ont été largement décrites, ce qui peut vraisemblablement compromettre la sensibilité et la spécificité de ces tests commerciaux à court terme (Hasan *et al.*, 2021). Au regard de la diversité croissante des variants émergents du SARS-CoV-2 divers tests ont été mis au point par des laboratoires. Il existe actuellement plusieurs tests développés et commercialisés, mais souvent sans que les performances globales et la sensibilité relative soient clairement définies (Artesi *et al.*, 2021). Cette étude a pour objectif d'évaluer la performance de la technique du criblage du SARS-CoV-2 par qRT-PCR comme méthode alternative au séquençage pour l'identification des variants du SARS-CoV-2.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

COLLECTION DES ÉCHANTILLONS

Cette étude a été réalisée au sein de l'unité des virus respiratoires de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire dans le cadre de la réponse à la pandémie de COVID-19. Les prélèvements utilisés pour cette étude ont été collectés au cours de la période de Mars à Octobre 2022, Un total de 257 échantillons nasopharyngés préalablement testés positifs avec le kit Biosensor (nCoV Real-Time Detection Kit) et conservés à -80°C ont été collectés pour l'étude. Tous les prélèvements avaient un seuil de positivité (Valeur de CT) ≤ 30 pour les gènes ORF1ab et N du SARS-CoV-2.

Extraction de l'ARN

L'extraction de l'ARN a été réalisée manuellement à l'aide du kit Viral RNA Mini kit de Qiagen (Qiagen Cat. No. 52904) conformément aux instructions du fabricant. L'ARN a été élué dans un volume de 60 μL de tampon AVE (Qiagen Cat. No. 52904).

Détection des variants du SARS-CoV-2 par le test criblage RT-qPCR

Le criblage des échantillons a été réalisé avec le kit RT-PCR DICOV-MOC/I MULTIPLEX (Montpellier, France). Le SARS-CoV-2 MOC/I Multiplex est un système qualitatif multiplex qui permet, pour chaque échantillon, l'amplification simultanée des

ARN cibles en une seule réaction. Ce kit est composé de deux pools de mélanges réactionnels (Mix 1 et Mix 2) correspondant respectivement à ARMFD-COV-1 et ARMFD-COV-2 ; Ce sont des mélanges réactionnels PCR lyophilisés contenant une transcriptase inverse, une polymérase, des amorces, des sondes d'hydrolyse, des oligonucléotides et des agents intercalants fluorescents pour l'amplification et la détection du génome du SARS-CoV-2 de type sauvage, des VOC (α , β , γ , δ , θ etc.) et VOI pour la recherche des mutations (N501Y, E484K, K417N, L452R/Q et P681H/R). Le protocole de préparation des réactifs et le programme d'amplification ont été suivis conformément aux instructions du fabricant de kit. Les courbes de fusion ont été analysées et l'interprétation des résultats a été faite à l'aide du logiciel breveté DISoft™, utilisant l'intelligence artificielle disponible à l'adresse suivante : <https://idsoft.hrm.di4diag.commande>.

DÉTERMINATION DES VARIANTS DU SARS-COV-2 PAR LE SÉQUENÇAGE ONT

L'ensemble des échantillons criblés avec le kit RT-PCR DICOV-MOC/I MULTIPLEX (Montpellier, France) ont été également séquencés à l'aide du MinIon MK1C (Oxford Nanopore Technologies). La library a été préparée selon le protocole ARTIC Midnight PCR tiling du virus SARS-CoV-2 avec le

kit de rapid barcoding (SQK-RBK110.96) disponible sur le site <https://www.protocols.io/view/ncov-2019-sequencing-protocol-rapidbarcoding-1200bgggjttw>. L'ADNc a été préparé à partir de l'ARN viral. Ainsi un volume de 8 µL de chaque ARN a été transcrits avec 2 µL de LunaScript RT SuperMix (LS RT) à l'aide d'un thermocycleur en utilisant le programme suivant : 25° C pendant 2 min, 55°C pendant 10 min, 95°C pendant 1 min, et maintien à 4°C. Par la suite deux réactions de PCR distinctes ont été effectuées pour chaque échantillon positif au SARS-CoV2. La première PCR a été réalisée avec le pool A d'amorces constitués de trente amorces qui génèrent les amplicons en mosaïque impairs, tandis que la deuxième PCR a été réalisé avec le pool B constitué de 28 amorces qui génèrent les amplicons en mosaïque pairs pour un ensemble de 1200 pb. La préparation du mélange réactionnel principal (Master mix) pour l'amplification du cDNA a été réalisée avec le kit Midnight RT-PCR Expansion (EXP-MRT001) contenant les deux pools d'amorces séparés (Freed *et al.*, 2020). Le mélange réactionnel pour 96 échantillons été constitué de 241 µl d'eau exempt de nucléase, 6 µl du pool A ou du pool B Midnight Primers, et 687 µl de Q5 HS Master Mix (Q5). Le programme d'amplification comportait une phase de dénaturation initiale à 98°C pendant 30 s, suivie d'une phase de 35 cycles comportant une dénaturation à 98°C pendant 15 s, une hybridation à 65°C pendant 5 min. Après amplification, une électrophorèse des produits amplifiés a été réalisée et seuls les amplicons de 1200 pb sont sélectionnés pour la suite du séquençage. Par la suite l'ajout des barcodes a été effectué dans la plaque de fixation de 96 puits en mélangeant 2,5 µL de nuclease free water, 5 µL du produits PCR regroupés (pools A et B) et 2,5 µL de barcode provenant du kit Rapid barcoding Plate. La réaction a été incubée dans un thermocycleur à 30°C pendant 2 minutes, puis à 80°C pendant 2 minutes. Ensuite les amplicons ont

été regroupés, puis purifiés à l'aide d'un volume égal de billes magnétiques AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, Californie, États-Unis) et quantifiés à l'aide d'un spectrophotomètre Qubit 4.0, en utilisant le kit Qubit dsDNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific). Il s'en est suivie une normalisation de la concentration de la Library. Pour le séquençage, le kit SQKRBK110.96 et EXP-MRT001 a été utilisé pour la préparation du Priming Mix et de la Library Mix qui ont été chargés par la suite sur une Flow-cell insérée dans le dispositif MinION Mk-1C (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK) selon les instructions. Lorsque le Run est terminé le fichier Fastq-pass est récupéré pour l'analyse des séquences.

ANALYSE BIO-INFORMATIQUE

Le basecalling et le démultiplexage des *reads* de séquençage au format FASTQ à été effectué en temps réel à l'aide de Guppy v5.0.7 (ARTIC Network, 2019) avec un modèle de haute précision. Un score de qualité minimum de 9 a été utilisé pour supprimer les bases de faible qualité. Les fichiers FASTQ démultiplexés ont été traités à l'aide du pipeline bio-informatique du réseau ARTIC (<https://artic.network/ncov-2019/ncov2019-bioinformatics-sop.html>). La lecture des séquences a été filtrées en utilisant la méthode artic guppyplex, et l'assemblage du génome basé sur la référence a été effectué en utilisant la méthode artic minion du pipeline bio-informatique ARTIC ONT de CIPHER (Bull *et al.*, 2020). La séquence consensus a été générée par mappage sur NC_045512.2 en tant que référence. La profondeur de lecture a été calculée à l'aide de samtools depth (Li , 2018). Pangolin v4.0.6 a été utilisé pour assigner des lignées aux génomes séquencés (O'Toole et al., 2021). Nextclade (Aksamentov et al. 2020) a été utilisé pour l'attribution des lignées ainsi que pour la visualisation et la comparaison des mutations au sein du génome viral.

RÉSULTATS

Sur l'ensemble des 257 échantillons positifs criblés avec le Kit DI SARS-CoV-2 MOC/I Multiplex, l'analyse des courbes de fusion (figure 1) a permis de détecter des mutations présentes sur 167 échantillons soit un taux de détection de 64,98 % (167/257). Les mutations K417N et/ou N501Y ont été détectées chez 35,93% (60/167) des échantillons indiquant ainsi la présence du

variant Omicron, mais les lignées correspondantes n'ont pas pu être identifiées par le Kit. (Tableau 1). Les autres mutations détectées ont conduit à l'identification des variants Alpha B.1.1.7 (8,38%), Delta B.1.617.2 (10,78%), Gamma P.1(5,39%), Beta B.1.351 (6,59%), Lambda C.37 (4,19%), Eta B.1.525 (5,39%), Omicron B.1.1.529 (23,35%) et autres Omicron différents

de la lignée B.1.1.529 (35, 93%). (Figure 1). Cependant 35,02% (90/257) des échantillons

présentaient un signal à la limite de détection du kit. (Figure 1).

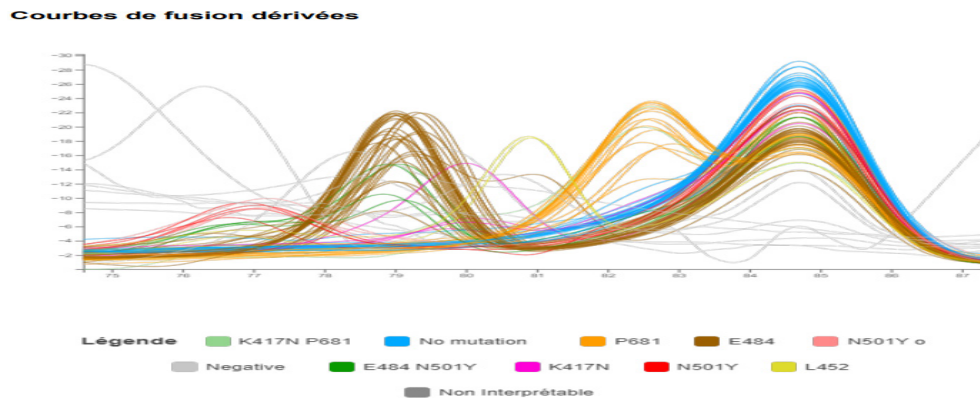


Figure 1 : Courbes de fusion présentant les mutations détectées par le kit de criblage

Tableau 1 : Mutations et variants détectés par criblage

Mutations détectés	Variants correspondant	Taux de détection
K417N ; E484K/Q et N501Y	Beta : β (B.1.351)	11 (6,59%)
P681H/R et N501Y	Alpha : α (B.1.1.7)	14 (8,38%)
P681H/R et L452R/Q	Delta : δ (B.1.617.2)	18 (10,78%)
E484K/Q	Eta : η (B.1.525) ou zeta : ζ (P.2) ou iota : ι (B.1.526)	09 (5,39%)
L452R/Q	lambda : λ (C.37)	07(4,19%)
N501Y et E484K/Q	Gamma : γ (P.1) ou C.1.2	09 (5,39%)
K417N et/ou N501Y	Omicron : o (B.1.1.529)	39 (23,35%)
K417N et/ou N501Yo	Variant omicron présentant un profil N501Y différent de lignée (B.1.1.529)	60 (35,93%)

Le séquençage du génome complet du SARS-CoV-2 et l'analyse de séquences effectuées sur les 257 échantillons ont permis d'identifier des variants dans 97,66% (251/257) des échantillons séquencés. Les variants détectés étaient les suivants : Omicron B.1.1.529 15% (39/251), Alpha 5,57% (14/251), Delta 7,17% (18/251), Gamma 3,58% (9/251), Lambda 2,78% (7/251), Eta 3,58(9/251), Beta 4,38% (11/251). L'analyse de séquences a également permis d'identifier d'autres variants Omicron de lignées différentes au B.1.1.529 57,37% (144/251) parmi lesquels des variants Omicron portant la Mutation N501Yo (60/167) qui n'ont pas puis être identifié par le test de criblage. Il s'agissait du variant Omicron BA.2 (31/251) et du variant Omicron BA.4

(29/251). La distribution des variants et des Lignées détectées par le séquençage est présentée sur la Figure 2. Le séquençage a permis dans un premier temps de confirmer les mutations d'identifier les variants détectés par le criblage. Ce qui a permis d'établir une concordance entre les variants détectés par les deux techniques. Dans un second temps le séquençage a permis de déterminer parmi les 90 échantillons qui étaient à la limite de détection du kit, les mutations pour l'identification des variants chez 84 échantillons. Une concordance de 100% a été notifiée au niveau des variants Alpha, Delta, Gamma, Lambda, Eta, Beta et Omicron (B.1.1.529) identifiés par le test de criblage et le séquençage ONT. Cependant au niveau des autres lignés différents de la lignée

(B.1.1.529) du variant Omicron une concordance de 41,67% a été observée. Le tableau 2 présente la répartition des variants et des lignées cor-

respondant détectées par criblage avec le kit DI SARS-CoV-2 MOC/I Multiplex et par séquençage effectué sur la Plate-forme ONT.

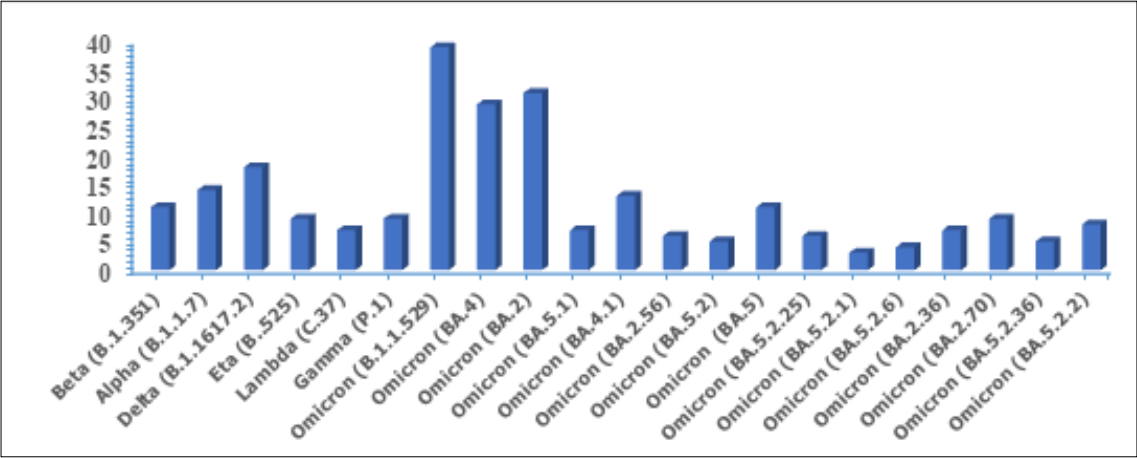


Figure 2 : Répartition des variants et lignées correspondantes détectés par séquençage

Tableau 2 : Répartition des Variants détectés par le test criblage et le séquençage ONT

Variants/Lignées	Criblage par RT-qPCR (167/257)	Séquençage ONT (251/257)	Taux de concordance par variants détectés
Beta : β (B.1.351)	Détecté : 11 (6,59%)	Détecté : 11 (4,38%)	11/11 (100%)
Alpha : α (B.1.1.7)	Détecté : 14 (8,38%)	Détecté : 14 (5,58%)	14/14 (100%)
Delta : δ (B.1.617.2)	Détecté : 18 (10,78%)	Détecté : 18 (7,17%)	18/18 (100%)
Eta : η (B.1.525)	Détecté : 09 (5,39%)	Détecté : 09 (3,59%)	09/09 (100%)
lambda : λ (C.37)	Détecté : 07(4,19%)	Détecté : 07(2,9%)	07/07 (100%)
Gamma : γ (P.1)	Détecté : 09 (5,39%)	Détecté : 09 (3,59%)	09/09 (100%)
Omicron : o (B.1.1.529)	Détecté : 39 (23,35%)	Détecté : 39 (15,54%)	39/39 (100%)
Autres Omicron différents du (B.1.1.529)	Détecté : 60 (35,93%)	Détecté :144 (57,37%)	60/144 (41,67%)

DISCUSSION

Cette étude a permis de comparer deux techniques d'identification des variants du SARS-CoV-2. Sur les 257 échantillon criblé par la technique de RT-qPCR, les variants ont été identifié dans 64,98% des échantillons analysés contrairement à la technique de criblage par séquençage ONT qui a permis l'identification des variants dans 97,66% des échantillons analysés. Cette différence peut s'expliquer par l'évolution des virus du SARS-CoV- 2 (Magazine *et al.*, 2022).

En effet les outils de dépistage rapide sont limités à suivre l'évolution du virus et détecter les différentes mutations. Au moment de l'utilisation du kits d'innovative diagnostic pour le criblage par RT-qPCR du SARS-CoV-2 en Côte d'Ivoire, certains variantes préoccupantes (VOC) tels que Alpha, Delta et plus majoritairement Omicron (B.1.1.529), se sont rapidement répandus dans le monde entier et ont contribué à la propagation de l'épidémie (Magazine *et al.*, 2022). Les muta-

tions prises en compte par le kit et son logiciel d'analyse, devrait permettre la détection de ces variants mais ne pouvait pas détecter de nouvelles sous lignées du Variant Omicron. La prévalence croissante de nouveaux variants du SARS-CoV-2 du fait des mutations dans leur génome rend de plus en plus difficile l'identification des variants (Altmann et al., 2021). Certains de ces virus émergents ont acquis des mutations dans plusieurs gènes, principalement dans le Spike qui augmentent la transmissibilité virale favorisant l'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte (Tao et al., 2021). À mesure que le SRAS-CoV-2 évolue, les lignées se divisent naturellement en sous-lignées descendantes, soit un groupe étroitement lié génétiquement provenant d'une même souche virale ancestrale. Les branches descendantes reçoivent de nouveaux pseudonymes de lignées, comme dans le cas des lignées B.1.1.529 (Omicron) (Cosar et al., 2022) qui a par la suite conduit à l'apparition de plusieurs sous lignées du variant Omicron (Dhawan *et al.*, 2022). Tous les variants identifiés par le criblage par la technique de RT-qPCR, l'ont été également par le séquençage avec une concordance de 100%. Cela témoigne de la spécificité du kit. Le kit emploie une analyse des

courbes de fusion en fin de PCR. L'analyse de la courbe de fusion après l'amplification permet de différencier les produits PCR spécifiques des produits non spécifiques ou des dimères d'amorces. Cela renforce la spécificité de l'essai et réduit la probabilité de résultats faussement positifs (Kiani et al., 2023). Le séquençage du génome complet reste la technique de choix pour l'identification des variants du SARS-CoV-2 circulants. Dans cette étude le séquençage a permis de confirmer les variants détectés par le kit de criblage mais également il a permis de révéler la présence des sous lignées d'Omicron (BA.1, BA.2, BA.4 et BA.5) qui n'ont pas pu être détectés par les tests de criblage. Plusieurs publications ont évalué les performances potentielles de différents kits de dépistage par PCR par rapport au séquençage du génome entier à l'aide de la technologie de séquençage NGS. Les auteurs ont confirmé une forte concordance entre les deux méthodes et démontrent qu'elles sont plus ou moins adaptées à une utilisation pratique dans les domaines du diagnostic et du dépistage. Toutefois, l'identification erronée de variants par RT-qPCR, dont l'appartenance à d'autres variants confirmée par séquençage a été rapportée par Dächert *et al.*, 2022.

CONCLUSION

L'utilisation de tests RT-qPCR multiplex a permis d'identifier les mutations pour la recherche des variants. Toutefois au vu des résultats de cette étude, le criblage par RT-qPCR doit être confirmé par le séquençage du génome entier du SARS-COV-2. Les tests de criblage utilisés permettaient jusqu'alors de distinguer le variant 20I/501Y.V1 (Alpha) et de manière non distincte les variants 20H/501Y.V2 (Bêta) ou 20J/501Y.V3 (Gamma). Au regard de la diversité croissante des variants émergents du SARS-CoV-2, cette stratégie de criblage se doit d'évoluer. Il se pourrait que les outils de dépistage rapide par le criblage semblent limités pour suivre l'évolution du virus et détecter les différentes mutations. Bien

que la NGS soit plus coûteuse, prenne plus de temps et nécessite des structures adaptées avec une expérience technique, cette technologie est actuellement l'unique outil capable de déterminer avec précision les différents variants et de suivre l'évolution du virus SARS-CoV-2. Le séquençage de génome complet est la meilleure méthodologie de confirmation d'un variant préoccupant. En effet des variants tels que Omicron qui présente plusieurs mutations, peuvent compromettre leur détection et sous-estimer la circulation virale. D'où la nécessité de renforcer les capacités en matière de bio-informatique et d'analyse des données génomiques.

RÉFÉRENCES

1. Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J. (2020). A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine* 382 (8), 727-733. Doi :10.1056/nejmoa2001017
2. Araf, Y., Akter, F., Tang, Y. D., Fatemi, R., Parvez, M. S., Zheng, C., Hossain, M. G. (2022). Omicron variant of SARS- CoV-2: genomics, transmissibility, and responses to current COVID-19 vaccines. *Journal of Medicine Virology*. 94 (5) :1825- 1832.

3. Rao, M., Rashid, F.A., Sabri, F., Jamil, N.N., Zain, R., Hashim, R. (2021). Comparing nasopharyngeal swab and early morning saliva for the identification of SARS-CoV-2. *Clinical Infectious Diseases*. 72 (9), e352–e356. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1156>.
4. Azzi, L., Carcano, G., Gianfagna, F., Grossi, P., Gasperina, D.D., Genoni, A. (2020). Saliva is a reliable tool to detect SARS-CoV-2. *Journal of Infectious*. 81 (1), e45–e50. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.04.005>
5. Wollschlaeger, P., Todt, D., Gerlitz, N., Pfaender, S., Bollinger, T., Sing, A. (2021). SARS-CoV-2 N gene dropout and N gene Ct value shift as indicator for the presence of B.1.1.7 lineage in a commercial multiplex PCR assay. *Clinical of Microbiology Infectious*. 27 (9), 1353.e1–1353.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.05.025>.
6. Ziegler, K., Steininger, P., Ziegler, R., Steinmann, J., Korn, K., Ensser, A. (2020). SARS-CoV-2 samples may escape detection because of a single point mutation in the N gene. *Euro-Surveillance* 25 (39), 2001650 <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.39.2001650>
7. Artesi, M., Bontems, S., Gobbels, P., Franckh, M., Maes, P., Boreux, R. (2021). A recurrent mutation at position 26340 of SARS-CoV-2 is associated with failure of the E gene quantitative reverse transcription-PCR utilized in a commercial dual target diagnostic assay. *Journal of Clinical Microbiology* 58 (10), e01598-20 <https://doi.org/10.1128/JCM.01598-20>.
8. Freed, N. E., Vlkova, M., Faisal, M. B., and Silander, O. K. (2020). Rapid and inexpensive whole-genome sequencing of SARS-CoV-2 using 1200 bp tiled amplicons and Oxford Nanopore Rapid Barcoding. *Biology Methods Protocol*. 5 (1), bpaa014. doi:10.1093/biomethods/bpaa014
9. ARTIC Network. 2019. ARTIC Network 2019. ARTIC nanopore protocol for nCoV2019 novel coronavirus. <https://github.com/artic-network/artic-ncov2019>. Accessed 4 October 2021
10. Bull, R. A., Adikari, T. N., Ferguson, J. M. (2020) Analytical validity of nanopore sequencing for rapid SARS-CoV-2 genome analysis. *Nature Communications* 11 :6272. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20075-6>
11. O'Toole, Á., Scher, E., Underwood, A., Jackson, B., Hill, V., McCrone, J.T., Colquhoun, R., Ruis, C., Abu-Dahab, K., Taylor, B. (2021) Assignment of epidemiological lineages in an emerging pandemic using the pangolin tool. *Virus Evolution*. 7 (2) 1-9 <https://doi.org/10.1093>
12. Li, H. M. (2018). Pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics*. 34(18):3094–100
13. Aksamentov, I., Roemer, C., Hodcroft, E. B., Neher, R. A. (2021). Nextclade: Clade assignment, mutation calling and quality control for viral genomes. *Journal Open Source Software*. 6 (23) 3773. [CrossRef].
14. Magazine, N., Zhang, T., Wu, Y., McGee, M.C., Vegiani, G., Huang, W. (2022). Mutations and Evolution of the SARS-CoV-2 Spike Protein. *Viruses*. 14, (640). <https://doi.org/10.3390/v14030640>
15. Altmann, D. M., Boyton, R. J., Beale, R. (2021). Immunity to SARS-CoV-2 variants of concern. *Science*. 371(6534): 1103-1104.
16. Tao, K., Tzou, P. L., Nouhin, J., Gupta, R. K., de Oliveira, T., Kosakovsky, P. S. L. (2021). The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Nature Reviews Genetics*. 22(12) :757-773.
17. Cosar, B., Karagulleoglu, Z. Y., Unal, S., Ince, A. T., Uncuoglu, D. B., Tuncer, G. (2022). SARS-CoV-2 mutations and their viral variants. *Cytokine Growth Factor Reviews*. 63 (14) 10–22. doi:10.1016/j.cytogfr.2021.06.001
18. Dhawan, M., Saied, A. A., Mitra, S., Alhumaydhi, F. A., Emran, T. B., Wilairatana, P. (2022). Omicron variant (B. 1.1. 529) and its sublineages: What do we know so far amid the emergence of recombinant variants of SARS-CoV-2?. *Biomedical Pharmacotherapy*. 154 (33) 113-522. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113522>
19. Kiani, S. J., Ramshini, M., Bokharaei-Salim, F., Donyavi, T., Eshрати, B., Khoshmirsafa, M., Ghorbani, S., Tavakoli, A., Monavari, S. H., Ghalejoogh, Z. Y., Abbasi-Kolli, M. (2023). High resolution melting curve analysis for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) variants. *Journals Acta Virologica*. 67(1) : 91-98. doi: 10.4149/av_2023_109. PMID : 36950889.
20. Dächert, C., Muenchhoff, M., Graf, A., Autenrieth, H., Bender, S., Mairhofer, H., Wratil, P. R., Thieme, S., Krebs, S., Grzimek-Koschewa, N. (2022). Rapid and sensitive identification of omicron by variant-specific PCR and nanopore sequencing: Paradigm for diagnostics of emerging SARS-CoV-2 variants. *Medicine of Microbiology and Immunology*. 211 (6), 71–77. [CrossRef]
21. Hasan, M. R., Sundararaju, S., Manickam, C., Mirza, F., Al-Hail, H., Lorenz, S. (2021). A novel point mutation in the N gene of SARS-CoV-2 may affect the detection of the virus by RT-qPCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 59 (4), e03278-20 <https://doi.org/10.1128/JCM.03278-20>