

**Karl Albert Brokstad**

(f. 1961) er professor i mikrobiologi og immunologi ved Høgskulen på Vestlandet. Han har også arbeidet innen virologifeltet siden begynnelsen av 1990 tallet, med spesielt fokus på immunologiske og molekylærbiologiske prosesser ved infeksjon og vaksinasjon. I tillegg er han i styringsgruppen til Bergen Covid-19 Research Group (BCRG).

**Rebecca Jane Cox**

(f. 1968) er professor i virologi og leder for Influenzasenteret, Universitetet i Bergen. Hun har forsket på influensa i over 30 år, og er prosjektleder for covid-19-forskning i BCRG. Hennes forskningsfelt er i første rekke knyttet til vaksiner, vaksineformulering- og administrering, både for influensa og covid-19.

SARS-CoV-2; Mutasjoner og varianter

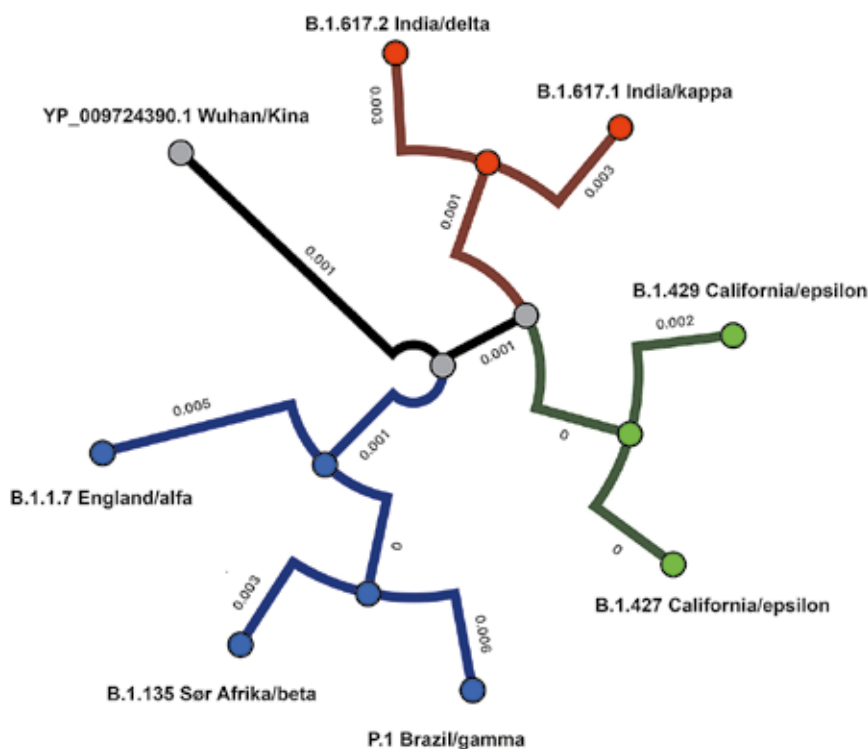
Vi har i den siste tiden sett hvordan delta-varianten av SARS-CoV-2 har fosset frem og nå er den dominerende varianten av viruset på de fleste kontinenter. Hva er disse variantene og hvordan oppstår de?

I desember 2019 kom de første rapporter om et utbrudd i Wuhan-provinsen i Kina, forårsaket av et nytt og ukjent virus. Det viste seg å være et koronavirus som var årsaken til det som har utviklet seg til å bli den mest alvorlige pandemien i nyere tid. Fire koronavirus har sirkulert i befolkningen gjennom mange år, men de har fått lite oppmerksomhet siden de har gitt svært milde forkjølelssymptomer. I 2002-2004 var det et utbrudd med begrenset omfang av et koronavirus i Sørøst-Kina og Hong Kong, som ga kraftige respiratoriske symptomer og fikk navnet SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) virus. I 2012 fikk vi et nytt utbrudd på den arabiske halvøy av et annet koronavirus, det såkalte MERS-viruset (Middle East Respiratory Syndrome), som fortsatt har sporadiske utbrudd. I alle disse tilfellene kommer virusene fra dyr som smitter til mennesker (zoonose). Det viser seg at vi kan finne virus i infiserte flaggermus, som er genetisk svært like de smittestoffene som vi nå har funnet hos mennesker.

Varianter av SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 er i konstant forandring og nye varianter oppstår hele tiden. En variant er ikke et enkelt virus, men en samling av forskjellige virus som har samme slektsmessige opphav og liknende mutasjonsmønster. Noen varianter kan potensielt ha endrede egenskaper, slik som å være mer aggressive eller mer

smittsomme enn det opprinnelige viruset. Verdens helseorganisasjon (WHO) og andre helseorganisasjoner har kalt varianter som man antar kan være mer aggressive eller smittsomme for bekymringsvarianter (variant of concern, VoC) eller interessante varianter (variant of interest, VoI) (Tabell 1) (1, 2, 7, 8). VoI er varianter som har mutasjoner som kan



FIGUR 1. Sirkulært fylogenetisk tre som viser slektskap mellom forskjellige varianter og referanseviruset fra Wuhan, Kina. Treet er laget basert på sekvens fra hele piggproteinet og laget i Unipro Ugene v39.0 (9).

ha betydning for økt spredning i befolkningen og som potensielt kan utvikle seg til mer aggressive former. VoC er mutanter som har endret seg og kan være mer smittsomme ved at viruset replikerer raskere og produserer flere virus, unnslipper allerede etablert immunforsvar etter tidligere infeksjon/vaksinasjon eller kan gi kraftigere symptomer og sykdom.

Det er rask spredning av de forskjellige virusvariantene. Det som vi kaller «den brasilianske varianten» kan ha spredd seg til alle kontinenter før den ble oppdaget i Brasil. Navnet gjenspeiler ikke hvor virusvarianten oppsto, men hvor den først ble oppdaget. De forskjellige variantene gir oss ny og viktig kunnskap, og siden virusene er i stadig forandring gir de fra seg et spor. Med avanserte bioinformatiske analyser er vi i stand til å avlese dette sporet og kan bestemme hvor viruset kommer fra og hvordan det har spredd seg i en populasjon (Figur 1). Det er derfor viktig å holde oversikt over varianter som sirkulerer i miljøet. Når

nye varianter oppstår kan de ta over og dominere i geografiske områder, det kan også føre til at tidligere dominerende varianter forsvinner for godt. Det har vi sett flere eksempler på.

I mange land bygges nå flokkimmuniteten gradvis opp ved at mange blir vaksinert eller har gjennomgått smitte. Så langt er ingen land kommet til det stadiet at de har oppnådd fullstendig flokkimmunitet. Vi ser at landene med høyest vaksinedekning merker den positive effekten ved langt færre alvorlig syke og døde i forhold til antall smittede. Ved økende vaksinasjonsdekning og økt beskyttelse i befolkningen vil SARS-CoV-2 møte motstand og spredning vil begrenses. Dette vil igjen føre til et seleksjonspress på viruset, og det vil prøve å endre seg slik at det unngår å bli gjenkjent og stoppet av det ervervete immunsystemet. Eksperimentelt ser vi at vaksinene som nå vanligvis er brukt gir noe redusert beskyttelse mot den indiske varianten (delta, B.1.617.2). Dette blir

støttet av flere rapporter hvor fullvaksinerte er blitt smittet med denne varianten. Vi ser også nå at nye VoC/VoI-varianter kommer raskere enn før.

Mutasjoner i piggprotein

Arvematerialet til SARS-CoV-2 består av en RNA-tråd som er over 29 000 nukleotider lang, og inneholder en rekke gener som koder for til nå 38 kjente proteiner. SARS-CoV-2 muterer kontinuerlig, og mutasjonene akkumuleres i alle deler av virusets gener. Når det blir mange mutasjoner kan det medføre at de fenotypiske egenskapene til viruset endres, og den regnes da som en ny variant.

Vi finner mange mutasjoner i nsp-3-genet, som er involvert i virusreplikasjon, og 3cl-pro-genet, som koder for en proteinase, men de aller fleste mutasjonene finner vi i S-genet. Dette genet på cirka 4000 nukleotider koder for piggprotein (spike protein, surface glycoprotein. S-protein), som er bygget opp av 1273 aminosyrer (Figur 2). Proteinene står ►

TABELL 1. Liste over SARS-CoV-2-varianter som helsemyndighetene overvåker fordi de mistenkes å kunne være mer smittsomme, mer aggressive, eller at vaksiner kan ha dårligere effekt. Øverst på listen (rosa bakgrunn) er varianter som er i den mest alvorlige kategorien; bekymringsvarianter (Variants of Concern, VoC). I midten av listen (gul bakgrunn) er varianter som er i kategorien interessante (Variants of Interest, Vol). Dette er varianter som er mindre aggressive, men som har potensiale til å utvikle seg til mer alvorlige varianter. Nederst på listen (blå bakgrunn) finner vi varianter som har vært VoC eller Vol, men som ikke anses som noen trussel lengre siden de mer eller mindre har forsvunnet fra sirkulasjon. Det er flere parallelle navnettinger på SARS-CoV-2-virusene; PANGOLIN (3) er oftest brukt i vitenskapelige sammenhenger og indikerer slektskap og utvikling av virusvariantene. Andre navnettinger er utarbeidet av WHO (1), Nextstrain (4) og GISAID (5). Kolonnen med endringer i piggprotein viser karakteristiske mutasjoner for de forskjellige variantene. Tabellen er satt sammen med informasjon fra WHO (1), CDC (2) og outbreak.info (6) og kan endre seg over tid.

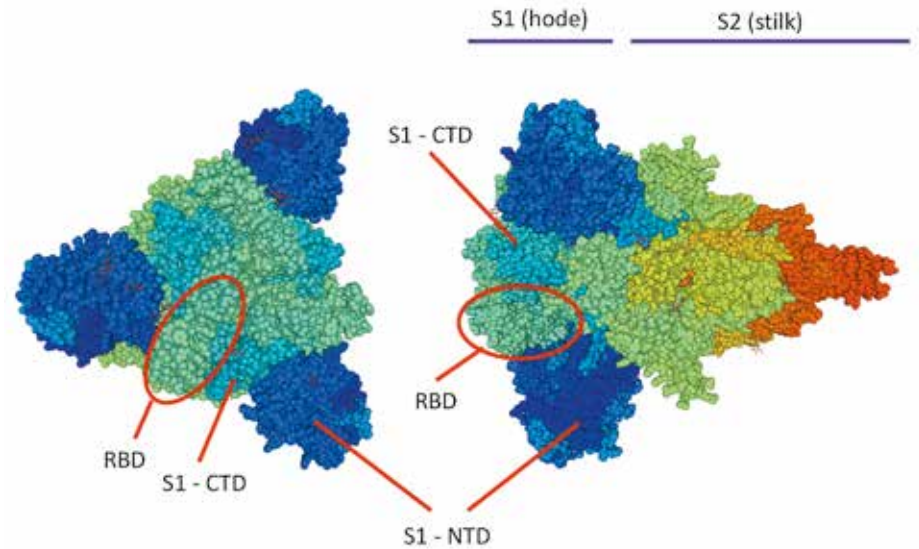
PANGOLIN (3)	Endringer i piggprotein (mutasjoner/delesjoner/modifikasjoner)	Nextstrain (4) GISAID (5)	WHO [1]	Først oppdaget
B.1.1.7	69del, 70del, 144del, (E484K*), (S494P*), N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H (K1191N*)	20I (VY) GRY	Alfa	Storbritannia
B.1.351	D80A, D215G, 241del, 242del, 243del, K417N, E484K, N501Y, D614G, A701V	20H (V2) GH/501.V2	Beta	Sør-Afrika
P.1	L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y, T1027I	20J (V3) GR/501Y.V3	Gamma	Brasil/Japan
B.1.617.2	T19R, (G142D), 156del, 157del, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N	21A G/478K.V1	Delta	India – desember 2020
B.1.525	A67V, 69del, 70del, 144del, E484K, D614G, Q677H, F888L	21D G/484K.V3	Eta	Storbritannia/Nigeria – desember 2020
B.1.526.1	L5F, (D80G*), T95I, (Y144-*), (F157S*), D253G, (L452R*), (S477N*), E484K, D614G, A701V, (T859N*), (D950H*), (Q957R*)	21F GH/253G.V1	Iota	USA (New York) – oktober 2020
B.1.617.1	(T95I), G142D, E154K, L452R, E484Q, D614G, P681R, Q1071H	21B G/452R.V3	Kappa	India – desember 2020
C.37	G75V, T76I, (R246N*), (247/253del*), L452Q, F490S, D614G, T859N	21G GR/452Q.V1	Lambda	Peru – desember 2020
B.1.617.3	T19R, G142D, L452R, E484Q, D614G, P681R, D950N	20A	ingen	India – oktober 2020
B.1.427	L452R, D614G	20C/S:452R	Epsilon	USA (California)
B.1.429	S13I, W152C, L452R, D614G	20C/S:452R	Epsilon	USA (California)
P.2	E484K, (F565L*), D614G, V1176F	20J	Zeta	Brasil – april 2020

ut som pigger på overflaten av virionet (= viruset i fri form), og er ansvarlig for at viruset fester seg til cellene i slimhinne hvor viruset først infiserer. På piggprotein er det spesielt ett område som er utsatt for mutasjoner; det reseptorbindende domene (RBD) i posisjon 319-541. Det er denne delen av piggprotein som binder til Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE-2)-reseptoren på vertscellen (Figur 2). Mutasjonene som per i dag brukes til å identifisere og differensiere mellom bekymringsvariantene ligger i aminosyreposisjon 417, 452, 478, 484 og 501 (Figur 3). Eksempelvis ligger aminosyren i posisjon 484 helt ytterst på piggprotein og er direkte koblet til ACE-2.

Navnsetting

Det er utviklet flere nomenklaturregler (navnesystemer) for SARS-CoV-2-variantene (Tabell 1). Populært sett har stammene fått navn etter hvor de er først oppdaget, for eksempel de britiske, brasilianske, sørafrikanske og indiske variantene. Systemet som WHO har introdusert er basert på greske bokstaver (1), men dette systemet gir ikke den oppløsningen og detaljene som er nødvendig for epidemiologer og forskere. Derfor brukes det forskerbaserte PANGOLIN (Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages)-systemet (3). PANGOLIN er primært et program som analyserer SARS-CoV-2-sekvenser og sammenlikner med andre kjente sekvenser og plasserer dette i tid og rom (5). Her får virusstammene/variantene en kode som består av en bokstav og én til tre tall, separert med punktum. Koden angir plassering i et fylogenetisk tre basert på slektskap og hvor varianten er isolert (Figur 1).

Et eksempel; en av de norske variantene har fått PANGOLIN kode B.1.1.333,



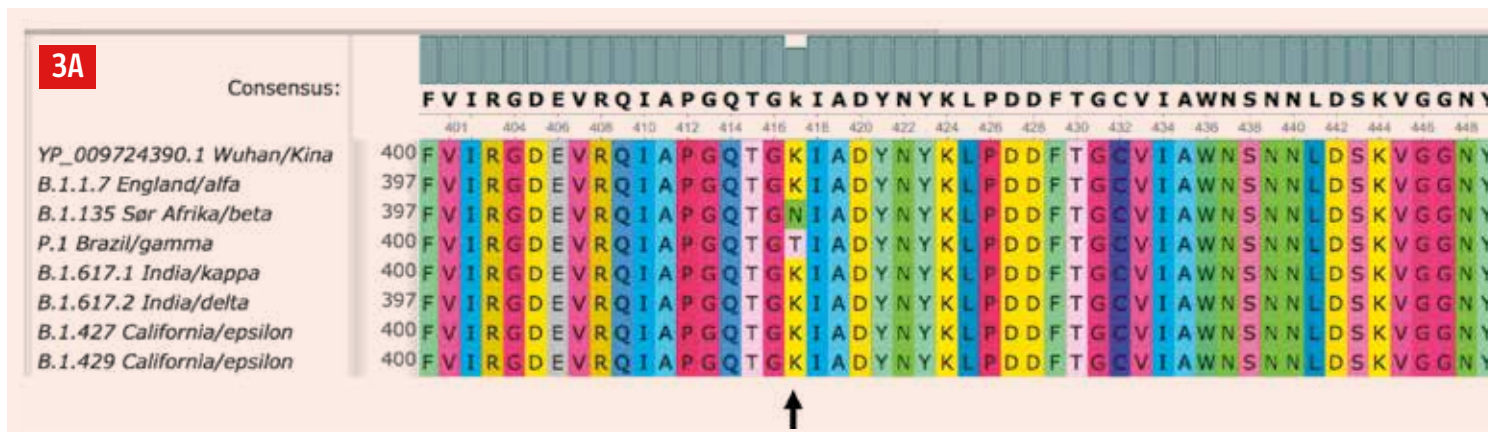
FIGUR 2. Strukturen til piggprotein. Til venstre sees proteinet ovenfra som en trimer (tre subenheter) og til høyre fra siden. Proteinets består av en stilk (S2) og et hode (S1). Stilken (S2) har som hovedoppgave å holde sammen de tre proteinstrengene og forankre proteinet i membranen. Hodet (S1) er delt inn i flere domener, N-terminalt domene (S1-NTD), reseptorbindende domene (RBD) og C-terminalt domene (S1-CTD). RBD er ansvarlig for binding til ACE-2-reseptoren på vertscellen. Figuren er laget i Swissmodel (10) med publiserte strukturdata (P0DTC2).

en variant som sirkulerte i Norge fra midten av november 2020 til slutten av mars 2021. Det finnes flere andre norske varianter som; B.1.1.451, B.1.36.21, B.1.242, og K.3 (B.1.1.277). Felles for B.1, som er den europeiske linjen, er at de har følgende mutasjoner (SNPer); 28881GA, 28882GA og 28883GC. Ikke alle variantene har karakteristiske mutasjoner i S-genet, men kan ha diskrete mutasjoner i andre gener. I tillegg til å ha oversikt over mutasjoner, er det viktig å vite hvor og når de forskjellige variantene sirkulerte. Mange av variantene kan ha forsvunnet fra sirkulasjon ved at andre varianter dominerer og tar over, mens

andre kan ha overlevd fordi forskere har tatt vare på dem i laboratorier. Grovt sett kan man si at linje A er roten til pandemien og mange isolater i denne gruppen kommer fra Kina. A.1 er en hovedlinje som hovedsakelig er funnet i USA, B.1 er en europeisk linje og C.1 er hovedsakelig afrikansk.

Identifisering av varianter

Her i Norge blir en del av de positive PCR-prøvene screenet for varianter på de enkelte prøvelaboratorier. Et utvalg av prøvene blir også sendt til FHI for fullsekvensering og detaljert karakterisering. Resultater blir også delt med GISAID



(Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data)-databasen (11)..

Det er utviklet en mengde prinsipielt forskjellige metoder for å identifisere varianter av SARS-CoV-2 (12, 13), og de baserer seg på å detektere forskjeller i virusgenene. Foreløpig finnes det ikke tilgjengelig godkjente immunologiske tester, men det kan komme med tiden. Valg av analysemetode i ulike laboratorier baseres på faktorer som etablert metodikk, tilgjengelig utstyr, integrering i rutinen, praktiske, økonomiske og personellmessige ressurser.

Det finnes en rekke metoder og automatisert utstyr for sekvensering av både DNA og RNA. For en grov tilnærming er det tilstrekkelig å sekvensere deler av gensekvensen som koder for RBD. Mutasjoner i aminosyreposisjonene 417, 452, 478, 484 og 501 kan brukes til å differensiere mellom VoC (Figur 3). Ønsker en mer nøyaktig identifikasjon må en gjerne sekvensere hele virusgenomet og legge sekvensen inn i PANGOLIN, som vil sammenlikne sekvensen mot alle publiserte sekvenser i GISAID-databasen (3, 5). Man kan også gjøre en genotyping hvor man undersøker flere mutasjoner samtidig i en reaksjon, f.eks. ved multipleks-PCR fragmentanalyse og påfølgende kapillærelektroforese (14). Lengden på PCR-fragmentene brukes til å identifisere variantene. En annen SNP-genotyping-smetode er utviklet ved at man benyt-

ter en blanding av mutasjonsspesifikke primere i PCR-reaksjonen (15). Disse primerne er merket med fluorescerende reportere som detekteres ved forskjellige bølgelengder. Den kanskje vanligste metoden som brukes som mutasjonsscreening er sanntids-PCR med påfølgende smeltekurveanalyse (16,17). Denne metoden er det enklere å integrere i en rutineanalyse, siden virusprøvene oftest blir analysert ved revers transkriptase PCR. Ved å kjøre asymmetrisk PCR (det vil si at ulik konsentrasjon av PCR-primere fører til ulik mengde av de to amplifiserte komplementære trådene) på de positive PCR-prøvene og benytte spesielt designede primere og prober, vil mutasjoner i amplikonet kunne påvises ved endret smeltemperatur.

Oppsummering

Aldri i nyere historie har et virus som SARS-CoV-2 hatt så stor påvirkning på økonomi og dagligdagse operasjoner. På kort sikt ble mye stengt ned og nå ett og halvt år senere begynner samfunnet å forsiktig åpne opp igjen. Det er forbundet med stor fare hvis viruset får herje fritt i samfunnet. Kombinasjon av mye sirkulerende virus og delvis beskyttelse kan føre til et sterkt seleksjonspress som kan drive viruset til å endre seg i en uønsket retning.

Koronaviruset har hele tiden vært svært smittomt og kan gi alvorlige

komplikasjoner i utsatte grupper, uansett hvilken variant en har blitt smittet med. Spesielt bør unge voksne være forsiktig, for selv om de fleste får milde sykdomssymptomer så er det mange i den gruppen som sliter med langtidsettevirkinger. Alle som ikke har særlig grunn, bør ta vaksinen når de får tilbud om det.

Hva har vi lært av covid-19-pandemien? Det viktigste er å raskt hindre spredning ved å begrense bevegelse og sosial kontakt, drive smittesporing og isolere smitte (TISK). Å lette på begrensninger av økonomiske grunner før en har full kontroll har vist seg å være en dårlig strategi. Selv om vaksineproduksjonen kom relativt raskt i gang etter pandemien ble erklært, har tilgang til nok vaksiner vært en begrensende faktor for å nå ønsket vaksinedekningsmål. Ved svineinfluensapandemien i 2009 ble ikke samfunnet lukket ned og da massevaksinering startet i oktober samme år gikk det ikke mange månedene før en stor del av befolkningen ble vaksinert. Nå er det slik at ingen pandemi er helt lik, men kanskje bør det offentlige få på plass produksjonsutstyr og andre ressurser som gjør oss mer forberedt når en ny pandemi bryter ut. ■

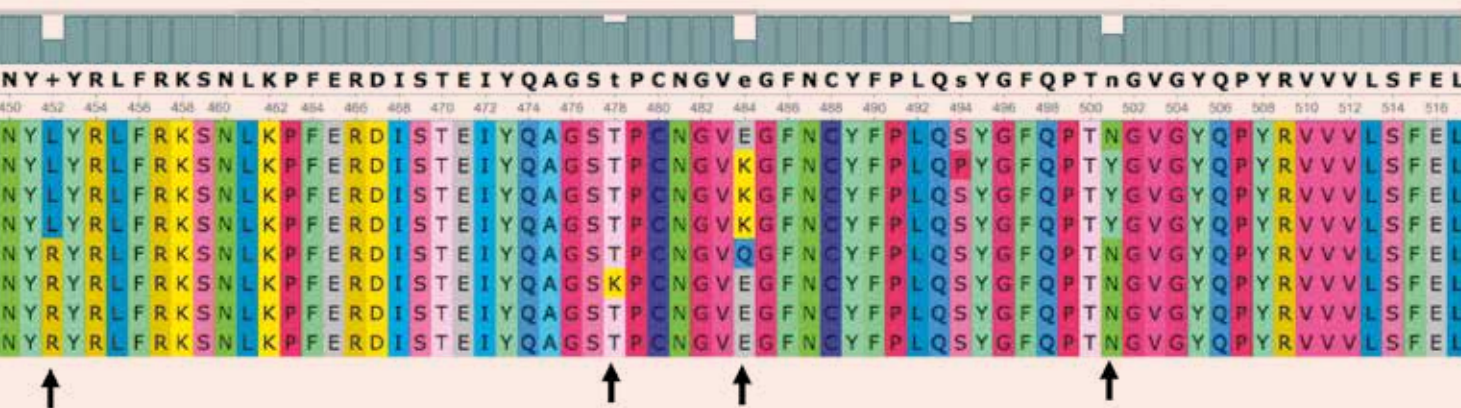
Referanser

1. World Health Organization (WHO). Tracking SARS-CoV-2 variants: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/> (29.8.2021).

FIGUR 3. A) En sammenlikning (alignment) av piggproteinsekvensene til bekymringsvarianter av SARS-CoV-2 utført i Unipro UGENE v39.0 (9). Øverst er referansecstammen som ble isolert i desember 2019 i Wuhan. Sammenlikningen viser posisjon 400 til 517 av aminosyresekvensen til piggproteinene, hvor RBD befinner seg. B) Tabellen viser mutasjonene i RBD som er mye brukt til å identifisere og differensiere mellom de forskjellige bekymringsvariantene.

3B

Bekymringsvarianter (VoC)	Spesifikke mutasjoner i RBD
B.1.1.7 – alfa	N501Y
B.1.351 - beta	K417N, E484K, N501Y
P.1 - gamma	K417T, E484K, N501Y
B.1.617.2 - delta	L452R, T478K, E484Q



- 2. Centers for Disease Control and prevention (CDC). SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-info.html> (29.8.2021).
3. SARS-CoV-2 lineages. Lineage list: https://cov-lineages.org/lineage_list.html (29.8.2021).
4. Nextstrain: <https://nextstrain.org> (29.8.2021).
5. Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data (GISAID): <https://www.gisaid.org> (29.8.2021).
6. Outbreak.info: <https://outbreak.info> (29.8.2021).
7. Folkehelseinstituttet (FHI). Påvisning og overvåking av SARS-CoV 2-virusvarianter: <https://www.fhi.no/nettpub/coronavirus/testing-og-oppfolging-av-smittede/pavisning-og-overvakning-av-sars-cov-2-virusvarianter/> (6.9.2021).
8. Folkehelseinstituttet (FHI). Rapport. Risiko ved covid-19-epidemien i Norge i lys av framveksten av Delta-varianten av SARS-CoV-2: <https://www.fhi.no/contentassets/c9e459cd7c-c24991810a0d28d7803bdo/2021-07-26-risiko-ved-covid-19-epidemien-i-norge-i-lys-av-framveksten-av-delta-varianten-av-sars-cov-2-.pdf> (6.9.2021).
9. UniPro Ugene: <http://ugene.net> (6.9.2021).
10. Swissmodel: <https://swissmodel.expasy.org> (6.9.2021).
11. Folkehelseinstituttet (FHI). Informasjon til mikrobiologiske laboratorier: <https://www.fhi.no/nettpub/coronavirus/testing-og-oppfolging-av-smittede/informasjon-til-mikrobiologiske-laboratorier/> (6.9.2021).
12. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Methods for the detection and identification of SARS-CoV-2 variants: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/methods-detection-and-identification-sars-cov-2-variants> (6.9.2021).
13. Labgatory. How to Detect COVID-19 Variants of Concern: <https://labmedicineblog.com/2021/04/28/how-to-detect-covid19-variants-of-concern/> (6.9.2021).
14. Clark AE, Wang Z, Cantarel B, Kanchwala M, Xing C, Chen L, et al. Multiplex Fragment Analysis Identifies SARS-CoV-2 Variants. medRxiv Preprint: <https://doi.org/10.1101/2021.04.15.21253747> (29.8.2021).
15. Harper H, Burrige A, Winfield M, Finn A, Davidson A, Matthews D, et al. Detecting SARS-CoV-2 variants with SNP genotyping. PLoS One. 2021;16(2):e0243185.
16. Park M, Won J, Choi BY, Lee CJ. Optimization of primer sets and detection protocols for SARS-CoV-2 of coronavirus disease 2019 (COVID-19) using PCR and real-time PCR. Exp Mol Med. 2020;52(6):963-77.
17. Banada P, Green R, Banik S, Chopoorian A, Streck D, Jones R, et al. A Simple RT-PCR Melting temperature Assay to Rapidly Screen for Widely Circulating SARS-CoV-2 Variants. medRxiv Preprint: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.03.05.21252709v2> (29.08.21).

Et litt overraskende forskningsresultat

Hemokromatose-blod-giverne ved sykehuset i Førde var ikke så fornøyde som forventet.

Av Grete Hansen

JOURNALIST

Det viser en undersøkelse som er presentert i en originalartikkel i dette nummeret av Bioingeniøren (s. 28-32).

– Det stemmer. Norsk Hemokromatoseforbund har sloss for at de medlemmene deres som har lavt ferritin kan være blodgivere. Derfor regnet vi med at de som fikk bli blodgivere var mer fornøyde enn de faktisk var. Man skulle tro at det var mye mer attraktivt å gi blodet til pasienter enn å kaste det, sier Turid Aarhus Braseth, hovedforfatter av artikkelen. Hun tilføyer:

– Undersøkelsen vår viste at både de som forble pasienter og de som ble blodgivere, stort sett var fornøyde, men pasientene var altså mer fornøyde.

Undersøkelsen ble gjort i Helse Førde. Der har sykehuset laget et opplegg for personer med hemokromatose, både for pasientene og blodgiverne. Braseth og de to medforfatterne av artikkelen (Anne Røsvik og Tor Hervig) ønsket å undersøke hvordan opplegget fungerer og hvor fornøyde de involverte var (pasienter og blodgivere). Med dette som bakgrunn ble spørreundersøkelsen utført.



Turid Braseth

Uavklarte forventninger?

Braseth tror at uavklarte forventninger om oppfølging, kan være årsaken til at blodgiverne ikke var like fornøyde som pasientene. Det kan tenkes at jevnlig oppfølging hos en hematolog, slik hemokromatosepasientene får, kjennes tryggere enn en samtale med blodbanklegen annethvert år (se fagartikkelen).

– Men i det øyeblikket disse personene er godkjent som blodgivere, er de ikke definert som pasienter lenger.

FAKTA | Hemokromatose

- Arvelig hemokromatose skyldes hovedsakelig mutasjonen C282Y, som bare finnes i den såkalt kaukasiske («hvite») befolkningen.
- I Norge er 0,7 prosent av befolkningen homozygot for hemokromatose. 25 prosent av kvinnene og 30 prosent av mennene med homozygot C282Y-mutasjon har forhøyet verdi for ferritin, og bare et lite mindretall (to til fem prosent) får alvorlig jernavleiring hvis de ikke behandles.

- Sykdommen skyldes at tynntarmen tar opp for mye jern. Over mange år kan det føre til vevsskadelig jerndeponering i flere organer, mest typisk i leveren, men også i bukspyttkjertelen, hjertet, gonadene og hypofysen.
- De vanligste symptomene er kronisk tretthet og leddsmerter.
- Behandlingen er blodtapping.

Kilde: Store medisinske leksikon