

**Vuosien 2009–2020 välillä esiintyneiden influenssavirus A/H1N1pdm09 -kantojen
vertailu**

Milja Belik

Pro gradu –tutkielma

Turun yliopisto
Biologian laitos
Marraskuu 2021

Ohjaajat:

Professori Ilkka Julkunen
Dosentti Laura Kakkola
FT Moona Huttunen
Dosentti Tiina Henttinen

*Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti
tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu
Turnitin OriginalityCheck-järjestelmällä*

TURUN YLIOPISTO, biologian laitos
Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

BELIK, MILJA: Vuosien 2009–2020 välillä esiintyneiden influenssavirus
A/H1N1pdm09 -kantojen vertailu

Pro gradu -tutkielma, 58 s.
Marraskuu 2021

Influenssa A -virukset (IAV) aiheuttavat pelkästään Euroopassa miljoonia sairastapauksia ja kymmeniä tuhansia kuolemia vuosittain. Toisinaan influenssaepidemat laajenevat maailmanlaajuisiksi pandemioiksi, jolloin leviävä influenssavirus sairastuttaa huomattavasti suuremman osan väestöstä ja sairaus voi olla poikkeuksellisen vakava verrattuna tavalliseen vuosittaiseen kausi-influenssaan. Tämän lisäksi IAV:t muuntuvat jatkuvasti, mikä johtaa joskus siihen, että virus saa kyvyn vaihtaa isäntäeläintä esimerkiksi linnusta ihmiseen. Jos lintuinfluenssavirus adaptoituu uuteen isäntäsoluun, pystyy se replikoitumaan siinä tehokkaasti ja tuottamaan suuria määriä infektiivisiä virioneja, jolloin tartutetjut saattavat alkaa edetä nopeasti ihmisten välillä. Influenssan aiheuttamien yhteiskunnallisten vaikutusten sekä pandemioiden aiheuttaman jatkuvan uhan vuoksi influenssaviruksissa tapahtuvien muutosten ja adaptiivisten mekanismien tunteminen on tärkeää, koska se voi auttaa sekä uuteen influenssapandemiaan valmistautumisessa että siihen nopeasti ja oikein reagoimisessa.

Tämän pro gradu -työn pääasiallisena tarkoituksena oli selvittää, onko A/H1N1pdm09:n replikaatiokyvyssä tapahtunut muutoksia kuluneen reilun kymmenen vuoden aikana siitä, kun virus ilmaantui influenssakaudella 2009–2010 ja aiheutti sikainfluenssaksi kutsutun maailmanlaajuisen pandemian. Muutoksia havainnointiin infektoimalla MDCK-, A549- sekä Vero E6 -solut yhdeksällä eri IAV-kannalla. IAV-kantojen proteiiniexpressiota sekä vRNA:n ja infektiivisten virionien tuottoa analysoitiin immunoblottaus-, RT-qPCR- ja plakkititrausmenetelmillä. Saatuja tuloksia verrattiin vuoden 2009 pandeemisen viruskannan tuloksiin.

Tulosten perusteella A/H1N1pdm09-viruskannat replikoituivat suurimmaksi osaksi hitaammin verrattuna vuoden 2009 pandeemiseen IAV-kantaan, eivätkä tulokset siten antaneet yksiselitteisiä viitteitä A/H1N1pdm09-viruksessa kymmenen vuoden aikana tapahtuneesta adaptoitumisesta ihmiseen tai muutoksista replikaatiokyvyssä. Samalla tulokista oli kuitenkin havaittavissa, että influenssakaudella 2019–2020 esiintyneen A/H1N1pdm09-kannan replikoituminen oli tässä tutkimuksessa tehokkaampaa kuin vuoden 2009 pandeemisen kannan replikoituminen. Työn toisena tarkoituksena oli samalla antaa suuntaa tuleville tarkempien adaptaatiomekanismien selvittämiseen tähtääville tutkimuksille, missä onnistuttiin hyvin.

ASIASANAT: Influenssa A -virus, A/H1N1pdm09, influenssapandemia, sikainfluenssa, replikaatiosykli, adaptaatio

LYHENTEET	1
1. JOHDANTO	2
1.1 Mitä ovat virukset?	2
1.2 Influenssa A -virukset	3
1.2.1 Influenssa A -virusalatyypit.....	5
1.2.2 Influenssa A -viruksen replikaatiosykli	6
1.2.3 Influenssavirusten aiheuttama hengitystietulehdus eli influenssa	9
1.3 Influenssa A -viruksen aiheuttamat pandemiat	10
1.3.1 Vuoden 2009 sikainfluenssapandemia	12
1.3.2 Influenssa A -viruksen aiheuttamat pandemian uhat.....	13
1.4. Influenssavirusten adaptaatio ja A/H1N1pdm09	13
1.4.1 Muuntelu influenssa A -viruksissa.....	13
1.4.2 Influenssa A -viruksissa tapahtuvan adaptaation mekanismit.....	15
1.4.3 Influenssavirus A/H1N1/pdm09	16
1.5 Tutkimuksen tarkoitus ja tutkimuskysymys	17
2. AINEISTO JA MENETELMÄT	18
2.1 Solulinjat ja soluviljely	18
2.2 Influenssa A -virusten eristys ja kasvatus	18
2.3 Plakkititraus	20
2.4 Influenssa A -viruskannat	21
2.5 Infektiokokeet	23
2.6 Immunoblottaus	24
2.7 Kvantitatiivinen käänteistranskriptaasi-PCR eli RT-qPCR	25
3. TULOKSET	27
3.1 Influenssa A -virusproteiinien ekspressio	27
3.2 Influenssa A -virus-RNA:n tuotto	34
3.3 Infektiivisten influenssa A -virionien tuotto	39
3.4 Tulosten yhteenveto	43
4. POHDINTA	45
4.1 Työssä käytettyjen solulinjojen vaikutus tuloksiin	45
4.2 Erot A/H1N1pdm09-viruskantojen replikaatiokyvyssä	47
4.3 Plakkien fenotyypit	49
4.4 Jatkotutkimusmahdollisuudet	51
4.5 Tutkimustulosten merkitys	52
LÄHTEET	54

LYHENTEET

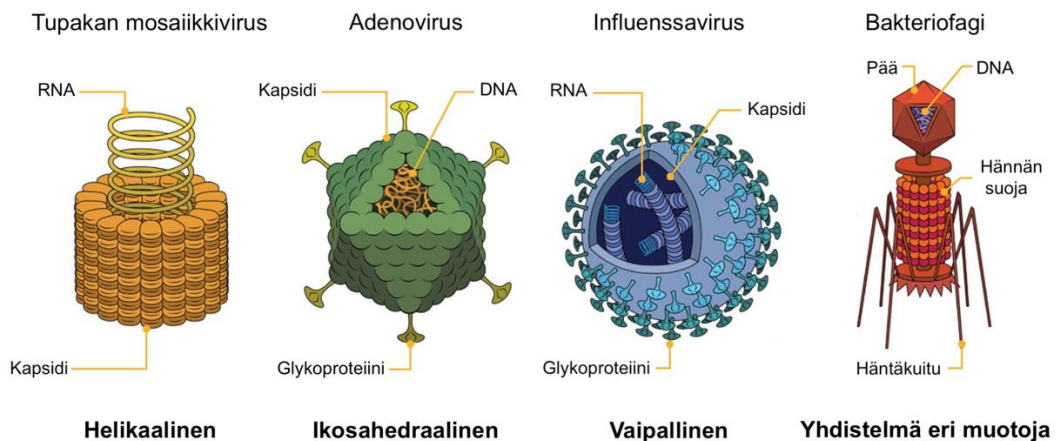
cRNA	komplementaarinen RNA (<i>engl.</i> complementary RNA)	PB1-F2	polymeraasiemäsproteiini 1-F2 (<i>engl.</i> polymerase basic protein 1-F2)
cRNP	komplementaarinen ribonukleoproteiini (<i>engl.</i> complementary ribonucleoprotein)	PB2	polymeraasiemäsproteiini 2 (<i>engl.</i> polymerase basic protein 2)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	PCR	polymeraasiketjureaktio (<i>engl.</i> polymerase chain reaction)
EDTA	etyleenidiamiinitetraetikkahappo (<i>engl.</i> ethylenediaminetetraacetic acid)	PFU	plakkeja muodostavat yksiköt (<i>engl.</i> plaque forming units)
FBS	naudan sikiön seerumi (<i>engl.</i> fetal bovine serum)	P/S	penisilliini/streptomysiini (<i>engl.</i> penicillin/streptomycin)
GAPDH	glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasi (<i>engl.</i> glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)	RdRp	RNA-riippuvainen RNA-polymeraasi (<i>engl.</i> RNA-dependent RNA-polymerase)
HA	hemagglutiniini (<i>engl.</i> hemagglutinin)	RNP	ribonukleoproteiini (<i>engl.</i> ribonucleoprotein)
IAV	influenssa A -virus (<i>engl.</i> influenza A virus)	SDS	natriumdodekyylisulfaatti (<i>engl.</i> sodium dodecyl sulfate)
MEM	Minimal Essential Medium	SDS-PAGE	natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi (<i>engl.</i> sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)
M1	matriisiproteiini 1 (<i>engl.</i> matrix protein 1)	TBS	Tris-puskuroitu suolaliuos (<i>engl.</i> Tris-buffered saline)
M2	matriisiproteiini 2 (<i>engl.</i> matrix protein 2)	TPCK	tosyylifenyylialanylikloorimetyyliketoni (<i>engl.</i> tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone)
mRNA	lähetti-RNA (<i>engl.</i> messenger RNA)	UTM	universaali siirtoliuos (<i>engl.</i> universal transport medium)
NA	neuraminidaasi (<i>engl.</i> neuraminidase)	vRNA	virus-RNA (<i>engl.</i> virus RNA)
NP	nukleoproteiini (<i>engl.</i> nucleoprotein)		
NS1	ei-rakenneproteiini 1 (<i>engl.</i> non-structural protein 1)		
NS2, NEP	ei-rakenneproteiini 2, tumakuljetusproteiini (<i>engl.</i> non-structural protein 2, nuclear export protein)		
PA	polymeraasihappoproteiini (<i>engl.</i> polymerase acidic protein)		
PA-X	polymeraasihappoproteiini-X (<i>engl.</i> polymerase acidic protein X)		
PBS	fosfaattipuskuroitu keittosuolaliuos (<i>engl.</i> phosphate buffered saline)		
PB1	polymeraasiemäsproteiini 1 (<i>engl.</i> polymerase basic protein 1)		

1. JOHDANTO

1.1 Mitä ovat virukset?

Virukset ovat mikroskooppisen pieniä infektiivisiä partikkeleja, jotka koostuvat pääosin geneettisestä materiaalista sekä sitä suojaavasta proteiinkuoresta eli -kapsidista; yhdessä näitä kutsutaan nukleokapsidiksi. Kapsidit voivat olla muodoltaan hyvin monenlaisia, mutta pääosin ne ovat joko helikaalisia eli sauvamaisia tai ikosahedraalisia eli lähes pyöreitä (kuva 1). Osalla viruksista on proteiinkapsidin ulkopuolella lipidivaippa ja siihen kiinnittyneenä erilaisia kalvoproteiineja.

Viruksen geneettinen materiaali eli genomi koostuu yhdestä tai useammasta nukleiinihappomolekyylistä, joka voi olla yksi- tai kaksijuosteista DNA:ta tai RNA:ta. Yksijuosteinen genomi voi olla polaarisuudeltaan positiivis- tai negatiivissäikeistä tai molempia eli ambisense-muotoista. Virusten genomi voi olla muodoltaan lineaarinen tai rengasmaisen, ja erityisesti RNA-virusten genomi on usein segmentoitunut useaksi erilliseksi molekyyliksi. (Pellett ym. 2014.)



Kuva 1. Ulkomuodoltaan erilaisia viruksia. Suurin osa viruksista on symmetrialtaan joko helikaalisia eli sauvamaisia tai ikosahedraalisia eli lähes pyöreän muotoisia. Osalla viruksista on nukleokapsidin lisäksi lipidivaippa ja siihen kiinnittyneenä erilaisia kalvoproteiineja. On myös olemassa viruksia, jotka koostuvat yhdistelmästä eri muotoisia osia. (Muokattu HMSC 2021).

Virukset luokitellaan niiden rakenteellisten ja genomisten ominaisuuksien perusteella perinteisesti viiteen taksonomiseen tasoon eli lahkoon, heimoon, alaheimoon, sukuun ja lajiin, mutta monitasoisempaa luokittelua on ehdotettu (Gorbalenya ym. 2020). Viruksia ei

nykykäsityksen mukaan luokitella kuuluvan mihinkään eliökunnan domeeniin, sillä ne eivät täytä eliön määritelmää; ne eivät kykene lisääntymään itsenäisesti eivätkä tuottamaan tai varastoimaan energiaa eikä niillä ole omaa aineenvaihduntaa, vaan virusten toiminnot ja lisääntyminen perustuvat elävien solujen infektoimiseen ja niissä loisimiseen. Infektoidessaan isäntäsolun virus kaappaa suuren osan sen biologisesta koneistosta haltuunsa tuottaakseen tarvitsemiaan entsyymejä ja virusrakennusyksiköitä uusien viruspartikkelien eli virionien tuottamiseksi ja kokoamiseksi. Muodostuneet lukuisat uudet virionit vapautuvat lopulta ulos solusta, jolloin ne voivat edelleen infektoida viereisiä soluja kudoksessa. Virusta kutsutaan virioniksi, kun virus esiintyy sen infektiivisessä solunulkoisessa muodossaan.

Virusen monistumiseen tarvittavaa prosessia kutsutaan virusen replikaatiosykliksi. Usein isäntäsolun toimintojen kaappaaminen vahingoittaa solua tai tuhoaa sen, mikä voi aiheuttaa vahinkoa myös koko isäntäorganismille ja ilmetä siinä erilaisina tauteina. Isäntäsoluna voi toimia minkä tahansa elävän organismin solu, kuten esimerkiksi bakteeri-, kasvi- tai eläinsolu. Ihmisiä infektoivia viruksia tunnetaan yli 20 heimoa ja yli 200 lajia, ja niitä löydetään lisää joka vuosi (Woolhouse ym. 2012).

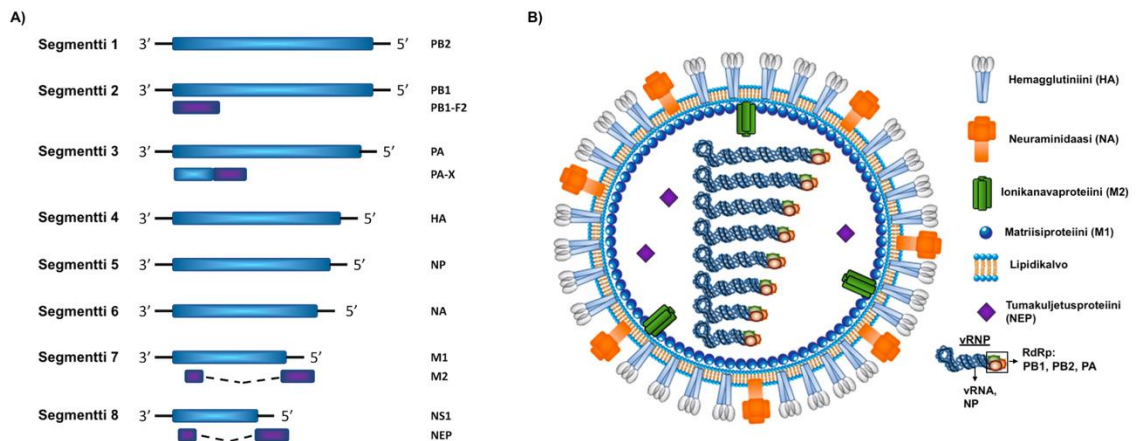
1.2 Influenssa A -virukset

Eräitä ihmisten kannalta merkittäviä viruksia ovat *Orthomyxoviridae*-heimoon kuuluvat influenssa A-, B-, C- ja D -virukset. Influenssavirus löydettiin, kun IAV eristettiin vuonna 1931 siasta. Sen jälkeen vuonna 1933 se eristettiin ensimmäisen kerran myös ihmisestä. Influenssavirukset ovat zoonoottisia viruksia eli ne kykenevät tarttumaan isäntälajista toiseen. Influenssa B- ja C -viruksia esiintyy pääasiassa vain ihmisillä ja influenssa D -viruksia pääasiassa vain nautakarjalla, kun taas influenssa A -virukset (IAV) infektoivat sekä ihmisiä että useita muita eläinlajeja. (Simonsen ym. 1998; Kakkola ym. 2021; Wolff & Veit 2021.)

Influenssa A -virionit ovat muodoltaan ikosahedraalisia, läpimitaltaan 100–140 nm, ja niillä on isäntäsolukalvolta peräisin oleva kaksoislipidikalvon muodostama vaippa (kuva 2B). IAV-genomi on yksijuosteista negatiivissäikeistä RNA:ta, ja se on kooltaan noin 13 500 emäsparia. Genomi on jakautunut kahdeksaan segmenttiin, jotka koodaavat virusen 12 proteiinia, joista yhdeksän on virionin muodostavia rakenneproteiineja ja kolme muita proteiineja (kuva 2A).

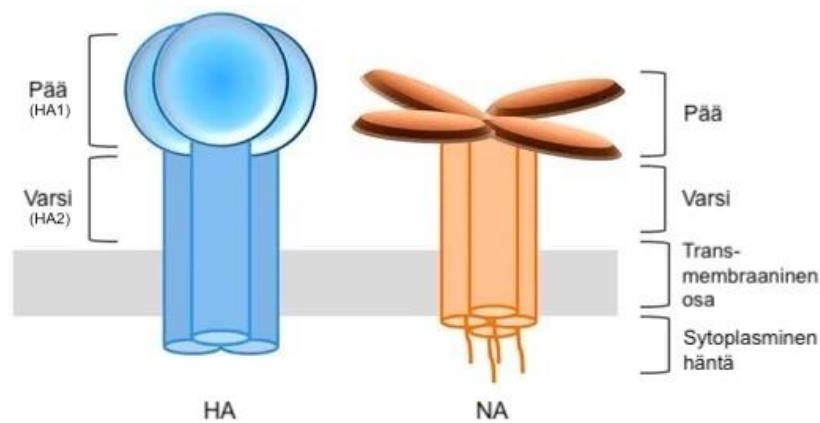
Polymeraasihappoproteiini (PA) sekä polymeraasiemäsproteiini 1 (PB1) ja polymeraasiemäsproteiini 2 (PB2) muodostavat RNA-segmenttien 5'- ja 3'-päihin sitoutuneet polymeraasikompleksit (RdRp). RNA-segmenttejä päällystää nukleoproteiini (NP), joka yhdessä RdRp-kompleksin kanssa muodostaa ribonukleoproteiini-kompleksin (RNP). RNP-komplekseja suojaa kapsidin muodostava matriisiproteiini (M1), ja kapsidinulkoiseen lipidivaippaan ovat kiinnittyneet glykoproteiinit hemagglutiniini (HA) ja neuraminidaasi (NA) sekä ionikanavaproteiini (M2). Pienempi M2-proteiini transloidaan samasta RNA-segmentistä kuin M1-proteiini vaihtohtoisen silmukoinnin avulla.

Muita kuin rakenneproteiineja ovat niin ikään vaihtohtoisen silmukoinnilla RNA-segmentistä 8 transloitavat NS1- ja NS2-proteiinit. NS2:sta käytetään myös nimeä tumakuljetusproteiini (NEP). Ei-rakenneproteiinit PB1-F2 ja PA-X transloidaan ribosomaalisen lukukehysvaihdoksen kautta samoista genomisegmenteistä kuin PB1 ja PA. (Kakkola ym. 2021.)



Kuva 2. IAV:n genomi, genomien koodaamat proteiinit ja virionin rakenne. A) IAV:n kahdeksasta negatiivissäikeisestä RNA-segmentistä koostuva genomi koodaa yhteensä 12:ta proteiinia. Yhdeksän niistä on virionin rakenneproteiineja. B) Matriisiproteiini (M1) muodostaa virionin kapsidin ja ionikanavaproteiini (M2) sekä glykoproteiinit hemagglutiniini (HA) ja neuraminidaasi (NA) ovat kiinnittyneet kapsidinulkoiseen lipidivaippaan. Segmenttien RNA-juoste on kauttaaltaan nukleoproteiinin (NP) peittämä. Polymeraasihappoproteiini (PA) sekä polymeraasiemäsproteiinit (PB1 ja PB2) muodostavat segmenttien 5'- ja 3'-päihin kiinnittyneen polymeraasikompleksin (RdRp). Yhdessä RdRp-proteiinien kanssa NP muodostaa ribonukleoproteiini-kompleksin (RNP), johon jokainen yksittäinen RNA-segmentti on pakattu. Kolme muuta genomien koodaamaa proteiinia ovat ei-rakenneproteiini 1 (NS1), ei-rakenneproteiini 2 (NS2), joka tunnetaan myös nimellä tumakuljetusproteiini (NEP), sekä PB1-F2 ja PA-X. (Muokattu Kakkola ym. 2021).

IAV:n pinnan HA ja NA glykoproteiinit ovat oleellisia viruksen infektiokyvyn kannalta, sillä ne vuorovaikuttavat kohdesolun pinnan reseptoriproteiinien kanssa. HA on kolmesta, rakenteellisesti samanlaisesta monomeerista koostuva homotrimeeri. Monomeerissa on kaksi alayksikköä; sylinterin muotoinen varsi (HA2) sekä siihen disulfididisidoksilla kiinnittyt globulaarinen pää (HA1) (kuva 3). Globulaarisissa päissä on siaalihappoa sitovat kohdat, jotka yhdessä muodostavat isäntäsolun reseptoriproteiiniin sopivan reseptoritaskun. NA on homotetrameeri, jonka monomeerit rakentuvat neljästä alayksiköstä. Nämä alayksiköt koostuvat katalyyttisesti aktiivisesta potkurin lapaa muistuttavasta kärjestä, lipidikalvon ulkoisesta varsiosasta, lipidikalvon läpäisevästä osasta sekä sytoplasmisesta hännästä. NA:n pääasiallinen tehtävä on pilkkoa siaalihapposidoksia. (Du ym. 2019.)



Kuva 3. IAV:n pintaproteiinien hemagglutiniinin (HA) ja neuraminidaasin (NA) rakenne. HA on homotrimeeri, jonka kolme monomeeriä koostuvat globulaarisesta päästä (HA1) sekä sylinterimäisestä varresta (HA2). NA on homotetrameeri, jonka neljä monomeeriä koostuvat lapamaisesta päästä, sylinterin muotoisesta varresta, transmembraanisesta osasta sekä sytoplasmisesta hännästä. (Muokattu Du ym. 2019).

1.2.1 Influenssa A -virusalatyypit

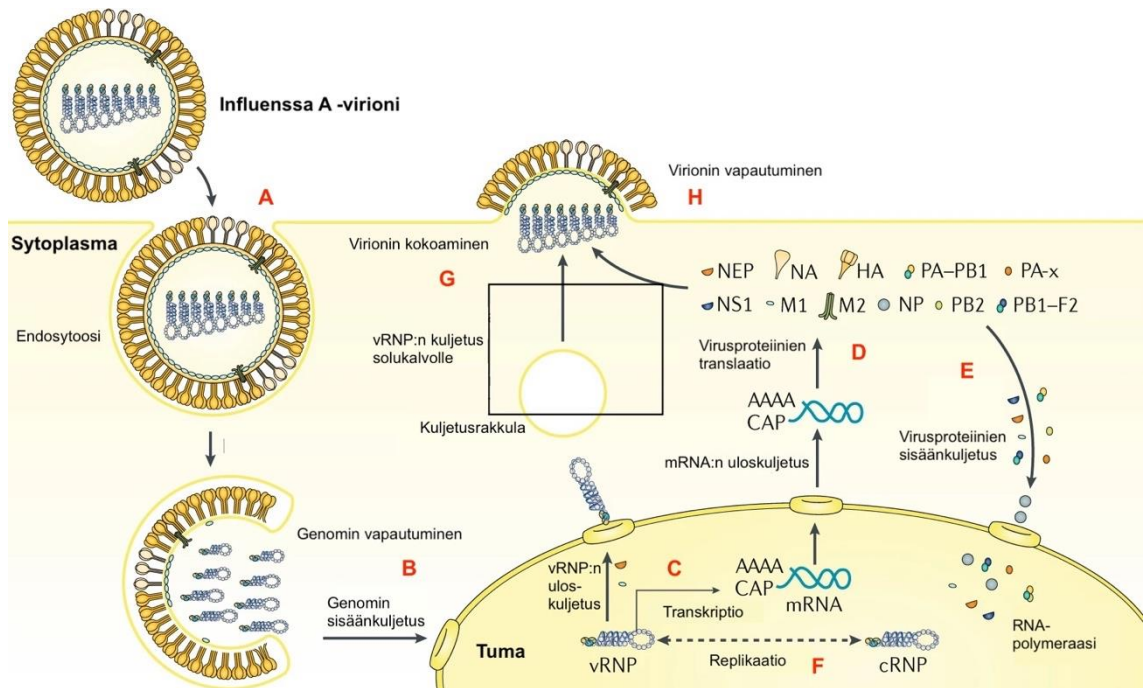
IAV:t jaetaan HA- ja NA-proteiinien rakenteen perusteella virusalatyyppeihin; esimerkiksi IAV-alatyypillä H1N1 on lipidikalvollaan HA-alatyyppejä 1 ja NA-alatyyppejä 1. Tällä hetkellä tunnetaan 18 HA:n alatyyppejä (H1–H18) ja 11 NA:n alatyyppejä (N1–N11), joista teoriassa voi muodostua 198 erilaista HA- ja NA-alatyyppeiden yhdistelmää ja siten yhtä monta erilaista IAV-alatyyppeä. Tämän tutkielman kirjoitushetkellä kirjallisuudessa on karakterisoitu 131 IAV-alatyyppeä.

IAV-alatyypit jaetaan edelleen kantoihin, jotka on eristetty tietystä potilasnäytteestä tietyssä paikassa ja tietynä ajankohtana. IAV-kannat nimetään virussuvun, -alatyypin sekä viruksen eristyspaikan ja -vuoden mukaan. Esimerkiksi puhuttaessa kannasta nimeltä ”A/New Caledonia/20/99(H1N1)” tarkoitetaan New Caledoniassa vuonna 1999 eristettyä IAV-kantaa numero 20, joka on IAV-alatyypiltään H1N1. Kannat jaetaan vielä kladeihin ja subkladeihin. Tämä jako perustuu HA-proteiinin geneettiseen samankaltaisuuteen yhteisen, niin kutsutun virus-esi-isän kanssa. (CDC 2017; Kakkola ym. 2021.)

Ihmisiä tehokkaimmin infektoimaan ja ihmisistä toisiin siirtymään kykyenevien IAV:ten HA-proteiinit ovat olleet alatyyppejä H1, H2 ja H3. Pääosin linnuissa infektoita aiheuttavien IAV:ten, joiden HA-proteiinit ovat alatyyppejä H5, H6, H7, tai H9, tiedetään aiheuttaneen ihmisissä yksittäisiä sairastapauksia tai tapausten ryppäitä. (Chen ym. 2014; WHO 2018a; Yang ym. 2020.)

1.2.2 Influenssa A -viruksen replikaatiosykli

Kuten muutkin virukset, myös influenssavirukset tarvitsevat monistuaakseen isäntäsolua ja sen biologista koneistoa. IAV:n replikaatiosyklin ensimmäiset vaiheet ovat virionin tarttuminen isäntäsoluun ja soluun tunkeutuminen (kuva 4). Virionin HA-pintaproteiinin globulaariset päät sitoutuvat isäntäsolun solukalvon glykoproteiinien ja -lipidien siaalihappoon, mikä aktivoi endosytoosin eli virionin sisäänoton endosomin sisällä.



Kuva 4. IAV:n replikaatiosykli infektoidussa solussa. A) Replikaatiosykli alkaa viruksen reseptorivälitteisellä endosytoosilla, jota seuraa B) virusgenomin vapautuminen solun sytoplasmaan ja kuljetus tumaan sisään. C) Tumassa virusgenomisegmentit transkriptoidaan mRNA:ksi, minkä jälkeen mRNA-juosteet kuljetetaan ulos tumasta ja D) transloidaan virusproteiineiksi solun sytoplasmassa. E) Osa tuottuneista virusproteiineista kuljetetaan suoraan solukalvolle ja osa tumaan sisään, missä myös F) virusgenomin replikaatio tapahtuu. G) Tuotetut genomireplikaatit ja virusproteiinit kuljetetaan vRNP-komplekseina ulos tumasta ja solukalvolle, missä solussa tuotetuista vRNA:sta ja IAV-proteiineista kootaan uusia virioneja. H) Lopuksi virionit vapautuvat solusta ulos kuroutumalla. (Muokattu Krammer ym. 2018).

Endosomin alhainen pH (5–6) saa aikaan HA-proteiinin konformaatiomuutoksen niin, että HA2-alayksikkö paljastuu ja tarttuu endosomin kalvoon, jolloin virionin ja endosomin lipidikalvot fuusioituvat. Alhainen pH saa aikaan konformaatiomuutoksen myös virionin lipidikalvon integraalisessa M2-ionikanavaproteiinissa, mikä johtaa kanavan aukeamiseen, protonien kulkeutumiseen virionin kapsidin sisälle ja virionin sisäisen pH laskuun. Tämän seurauksena vRNP-kompleksit vapautuvat viruskapsidin M1-proteiineista ja kulkeutuvat ulos endosomista solun sytoplasmaan.

IAV:n genomin transkriptio ja replikaatio tapahtuvat solun tumassa (kuva 4). Solun importiinit eli tumakuljetusproteiinit tunnistavat vRNP-kompleksin muodostavien proteiinien (NP, PB1, PB2 ja PA) sisältämät tumalokalisatiosekvenssit ja kuljettavat kompleksit, ja niiden mukana viruksen genomisegmentit, sytoplasmosta tumaan. Isäntäsolun replikaatio- ja translaatiokoneistot eivät kykene lukemaan negatiivissäikeistä RNA:ta, minkä vuoksi viruksen RNA-segmentit käännetään tumassa positiivissäikeisiksi mRNA- ja

cRNA-juosteiksi viruksen polymeraasikompleksi RdRp:n katalysoimana. (Samji 2009.) IAV:n replikaatio tapahtuu kahdessa vaiheessa. Ensimmäisessä vaiheessa RdRp-kompleksi tekee vRNA-segmentille komplementaarisen cRNA-juosteen, josta muodostuu uusien RdRp-kompleksien ja NP:ien kanssa cRNP. Toisessa vaiheessa cRNA-juoste toimii templaattina RdRp-kompleksin katalysoidessa uusia vRNA-segmenttejä, joista koostetaan uusia vRNP:eja. (Fodor 2013.) Usean replikaatiokierroksen jälkeen tuottuneet vRNP:t kuljetetaan ulos tumasta ja solukalvolle kuljetusrakkuloiden mukana (Amorim ym. 2011).

Tumassa RdRp-kompleksi sitoutuu isäntäsolun omaan pre-mRNA-juosteeseen, katkaisee sen 5'-cap-rakenteen ja käyttää sitä uuden virus-mRNA-juosteen transkriptioalukkeena. Isäntäsolun tuottamien 5'-cap-rakenteiden kaappaamisesta virusgenomin transkriptiota varten käytetään termiä "cap-snatching". Cap-snatching estää solun omien proteiinien translaatiota, koska mRNA:ta ei voida lukea ilman 5'-cap-rakennetta. RdRp transkriptoi vRNA-segmentin ja lisää koodaavan mRNA-juosteen 3'-päähän poly(A)-hännän, eli juoste polyadenyloituu. (Fodor 2013; Stubbs & te Velthuis 2014.) IAV:n genomien segmentti 7 koodaa vaihtoehdoisen silmukoinnin ja siitä seuraavan lukukehysmuutoksen avulla M1- ja M2-proteiinialayksiköitä ja segmentti 8 samalla mekanismilla NS1- ja NS2-proteiinialayksiköitä, minkä vuoksi transkriptit viimeistellään käyttäen isäntäsolun spliceosomeja (Kakkola ym. 2021).

Valmiit virus-mRNA:t kuljetetaan tumasta ulos sytoplasmaan, jossa ne transloidaan proteiineiksi sytosolin vapaissa ribosomeissa (PA, PA-X, PB1, PB2, NP, NS1, NS2 ja M1) sekä karkeaan solulimakalvostoon kiinnittyneissä ribosomeissa (HA, NA ja M2). Vastamuodostuneet virusproteiinit kulkeutuvat sytoplasmasta tumaan solun importiinien kuljettamina tai passiivisella diffuusiolla. Tumassa ne säätelevät muun muassa vRNA:n transkriptiota ja replikaatiota ja sekä virus- että isäntäsoluproteiinien tumakuljetusta. (Gao ym. 2014; Li ym. 2015.) Ei-rakenteelliset proteiinit NS1, PB1-F2 ja PA-X estävät synnynäiseen immuunipuolustukseen kuuluvia interferonien tuotantoa ja toimintaa. Kohdesolussa interferonit vaikuttavat spesifisten reseptorien kautta, aktivoivat antiviraalisten geenien ilmentymistä ja estävät replikaatiosyklin ja virusinfektion etenemistä. NS1 estää interferonien tuottoa sekä toimii interferonien aktivoimien proteiinien inhibiittorina ja vastavaikuttajana. (Price ym. 2000; Melén ym. 2007.) Myös PB1-F2 ja PA-X vaikuttavat isäntäsolun immuunivasteiden vaimentamiseen muun muassa inhiboimalla interferonien tuottoa ja aktivoimalla solun apoptoosimekanismeja (Klemm ym. 2018).

HA syntetoidaan HA0 esiasteproteiinina, jonka isäntäsolun proteaasit pilkkovat HA1 ja HA2 alayksiköiksi. HA0-esiasteproteiinin pilkkoutuminen on välttämätöntä viruksen infektiivisyyden kannalta, sillä ilman toimivia HA-alayksiköitä virus ei kykene sitoutumaan isäntäsolun solukalvon reseptoriproteiineihin. Solulimakalvostossa HA-alayksiköt kootaan trimeerimuotoon ja NA-alayksiköt tetrameeriksi, ennen kuin ne kuljetetaan kuljetusrakkuloissa solukalvolle. (Stubbs & te Velthuis 2014; Kakkola ym. 2021.) Näille solukalvoalueille kulkeutuvat tumasta vRNP:t sekä vapaissa ribosomeissa tuotetut ja tumaan kuljetetut virusproteiinit. Solukalvolla vRNP:istä ja IAV-proteiineista kootaan uusia virioneja. Virionin kapsidin muodostavat M1-proteiinit taivuttavat solun lipidikalvoa muodostaen siitä suojavaipan kapsidin ympärille ottaen samalla lipidikalvoon uponneet viruspintaproteiinit mukaansa. Lipidikalvon taipuminen johtaa virionien kuroutumiseen irti isäntäsolusta. Virionin lipidikalvolla oleva NA katkaisee HA:n ja solun pintaproteiinien väliset siaalihapposidokset, jolloin virioni pääsee kulkeutumaan solunulkoisessa nesteessä ja infektoimaan muita soluja. (O'Neill ym. 1998; Nayak ym. 2004.)

1.2.3 Influenssavirusten aiheuttama hengitystietulehdus eli influenssa

Influenssavirusten infektio ja monistuminen tapahtuvat hengitysteiden epiteelisoluissa, mikä aiheuttaa hengitysteiden tulehdusreaktion ja sairauden, jota kutsutaan influenssaksi. Influenssavirusinfektio aikaansaa elimistössä erilaisia immuunivasteita sekä solu- ja kudosaaurioita, jotka aiheuttavat influenssalle tyypilliset yhtäkkisesti ilmaantuvat oireet kuten korkea kuume, nuha ja nenän tukkoisuus, kuiva yskä, kurkkukipu, lihaskivut, väsymys ja päänsärky. Erityisesti lapsilla saattaa esiintyä lisäksi ripulia ja pahoinvointia. Oireet alkavat yleensä 1–4 päivää altistumisesta ja kestävät tyypillisesti 1–2 viikkoa. Suuri osa tartunnan saaneista ei kuitenkaan saa minkäänlaisia oireita. (WHO 2018b; THL 2020.)

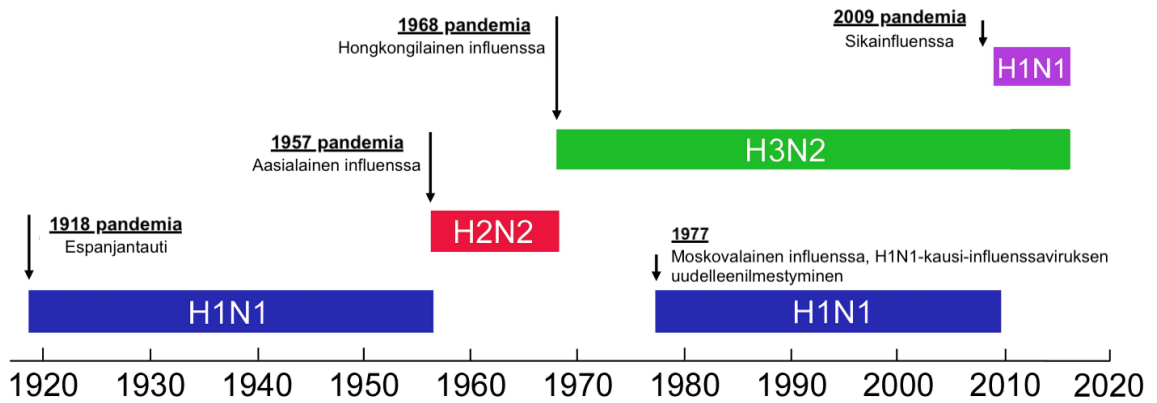
Influenssavirukset aiheuttavat Euroopassa vuosittain arviolta 4–50 miljoonaa sairastapausta ja 15 000–70 000 ennen aikaista kuolemaa. Influenssaan sairastunut on altis jälkitauteille, ja influenssaan liittyvät kuolemat johtuvatkin yleensä bakteeri-infektion aiheuttamasta jälkitaudista, kuten keuhkokuumeesta, tai ennestään henkilöllä olleen perussairauden oireiden pahenemisesta. Influenssaa ja sen jälkitauteja voi tehokkaasti ehkäistä influenssarokotteella, oikealla yskintäteknikalla ja hyvällä käsihygienalla. (THL 2020.)

Influenssavirukset leviävät ihmisestä toiseen pääasiassa ilmapölyisenä pisaratartuntana tai kun ihminen koskettelee ensin viruspitoisia pintoja ja sen jälkeen kasvojaan, jolloin virukset kulkeutuvat nenän tai suun limakalvoille ja sieltä pidemmälle hengitysteihin. Influenssavirukset leviävät kausittaisesti aiheuttaen vuotuisia epidemia-aaltoja ympäri maailmaa. Suomessa influenssakausi kestää yleensä marraskuusta huhtikuuhun, tapausmäärien huipun ajoituksessa helmi-maaliskuun väliselle ajalle. Influenssaa aiheuttavat sekä A-että B-influenssavirukset. IAV-alatyypit H1N1 ja H3N2 aiheuttavat yleensä suurimman osan tapauksista, ja H3N2 aiheuttaa tyypillisesti hieman vakavampia oireita kuin H1N1. Myös influenssavirus C kykenee infektoimaan ihmisiä, mutta se aiheuttaa yleensä vain lievän taudin, eikä sen tiedetä aiheuttavan epidemioita. (Kaji ym. 2003; THL 2020.)

Influenssaepidemat voivat toisinaan laajeta jopa pandemioiksi. Influenssapandemiasta puhutaan, kun verrattuna vuotuisen kausi-influenssaan leviävä virus sairastuttaa normaalia huomattavasti suuremman osan väestöstä, leviää jopa ympäri maailman, ja sairaus on poikkeuksellisen vakava verrattuna tavalliseen vuosittaiseen kausi-influenssaan. Pandemiajulistuksen tekee Maailman terveysjärjestö WHO. (Fimea 2020.)

1.3 Influenssa A -viruksen aiheuttamat pandemiat

Historiallisia kirjoituksia analysoimalla on pystytty päättämään, että influenssapandemiat ovat kiertäneet maailmaa kohtalaisella varmuudella ainakin keskiajalta asti ja todennäköisesti kauemminkin (Franco-Paredes ym. 2009; Taubenberger & Morens 2009; Tognotti 2009). Viimeisen hieman yli sadan vuoden aikana on esiintynyt neljä influenssaviruksen aiheuttamaa pandemiaa ja ne aiheuttaneet IAV:t ovat kaikki omanneet HA-pinta-proteiinin alatyypiltään H1, H2 tai H3 (kuva 5).



Kuva 5. Viimeisen reilun sadan vuoden aikana esiintyneet IAV-pandemiat sekä pandemiat aiheuttaneet virusalatyyppit. Vuosien 1918–2020 välillä maailmaa on kiertänyt kolme IAV-alityyppiä, jotka ovat sinä aikana aiheuttaneet neljä pandemiaa. Pandemian jälkeen ne ovat jääneet kiertämään vuosittaisina kausi-influenssaviruksina. Vuosina 1918–1957 ja 1977–2009 kiertänyt H1N1 eroaa geneettisesti merkittävästi vuonna 2009 ilmestyneestä H1N1-alityypistä, minkä vuoksi se on esitetty kuvassa eri värillä. (Muokattu McCullers 2016).

Ensimmäinen ja vakavin pandemia oli vuosina 1918–1920 ympäri maailman nopeasti levinnyt H1N1-viruksen aiheuttama espanjantauti. Espanjantaudin sairasti arviolta 300 miljoonaa ihmistä ja tautiin menehtyi 20–50 miljoonaa ihmistä maailmanlaajuisesti. (Simonsen ym. 1998; Johnson & Mueller 2002; Franco-Paredes ym. 2009.) Suomessa espanjantaudin on arvioitu aiheuttaneen noin 20 000 kuolemaa, mutta vain hieman aiemmin riehuneeseen sisällissotaan liittyvien kuolemien vuoksi tarkan määrän arvioiminen on vaikeaa (Linnanmäki 2005). Taudin alkuperästä ei edelleenkään ole täyttä varmuutta, mutta sen uskottiin lähteneen liikkeelle Espanjasta, mistä juontuu pandemian nimitys. Espanjantaudin jälkeen H1N1 jäi kiertämään kausi-influenssana, kunnes katosi ihmisten keskuudesta vuonna 1957. Virus ilmestyi uudelleen 1977 niin kutsutun moskovalaisen influenssan muodossa ja jäi kiertämään maailmaa aiheuttaen vuotuista kausi-influenssaa. (Zamstelskaja ym. 1978; Simonsen ym. 1998.)

Espanjantaudin jälkeen kului lähes neljäkymmentä vuotta ennen seuraavaa influenssa-pandemiaa, kunnes vuonna 1957 ihmisten keskuudessa alkoi jälleen kiertää uudenlainen IAV-alityyppi, H2N2. Se syrjäytti kausi-influenssana kiertäneen H1N1-viruksen ja aiheutti maailmanlaajuisen pandemian, joka sai nimen aasialainen influenssa. Ensimmäiset sairastapaukset havaittiin Hong Kongissa. (Loosli & Langmuir 1961.) Aasialainen influenssa aiheutti arviolta 1–4 miljoonan ihmisen kuoleman maailmanlaajuisesti (Simonsen ym. 1998; Viboud ym. 2015). Suomessa epidemia oli pahimmillaan vuoden 1957 marraskuusta seuraavan vuoden tammikuuhun ja vaati yhteensä 1 800 ihmisen hengen

(Linnanmäki 2005). H2N2 ei tiedetä vuoden 1968 jälkeen enää tartuttaneen ihmisiä, mutta virusreservi on säilynyt linnuissa (Schäfer ym. 1993; Ma ym. 2014).

H2N2-alatyypin syrjäytti vain noin kymmenen vuotta aasialaisen influenssan jälkeen, vuosina 1968–1970, maailmalla levinnyt uusi pandemia. Se sai alkunsa Kaakkois-Aasiasta, ja ensimmäiset tautitapaukset löydettiin jälleen Hong Kongista. Tällä kertaa tauti nimettiin hongkongilaiseksi influenssaksi, ja kiertänyt IAV oli alatyypiltään H3N2. (Kilbourne 2006.) Epidemian aikana hongkongilaiseen influenssaan sairastui noin 70 % suomalaisesta aikuisväestöstä (Pyhälä 2000). Kuolemantapauksia Suomessa oli noin tuhat ja suurin osa niistä tapahtui vasta taudin toisessa aallossa vuonna 1969 (Linnanmäki 2005). Maailmanlaajuisesti pandemian seurauksena kuoli arvioiden mukaan noin miljoona ihmistä (Viboud ym. 1968; Simonsen ym. 1998). H3N2 jäi yhdessä vuonna 1977 uudelleen ilmestyneen H1N1:n kanssa kiertämään ihmisten vuotuisena kausi-influenssaviruksena (Simonsen ym. 1998).

1.3.1 Vuoden 2009 sikainfluenssapandemia

Neljäs ja viimeisin influenssaviruksen aiheuttama pandemia alkoi influenssakaudella 2009–2010, jolloin maailmaa kiersi jälleen IAV alatyypiltään H1N1. Kyseessä oli kuitenkin geneettisesti uudenlainen virus, joka syrjäytti vuodesta 1977 asti kausi-influenssana kiertäneen H1N1:n, mutta ei H3N2:ta, joka jäi edelleen kiertämään uudentyyppisen H1N1-viruksen rinnalle. Virus oli niin kutsuttu kolmoisreassortantti, joka koostui yhdistelmästä sian, linnun ja ihmisen influenssavirusgeenejä. Tauti nimettiin sikainfluenssaksi, koska virus muistutti eniten sian influenssavirusta: kahdeksasta RNA-genomisegmentistä viisi oli peräisin sian influenssaviruksesta, kaksi lintuinfluenssaviruksesta ja yksi ihmisen influenssaviruksesta. (Garten ym. 2009.)

Sikainfluenssa lähti liikkeelle Meksikosta, ja ensimmäiset sairastapaukset havaittiin huhtikuussa 2009 Yhdysvalloissa Kaliforniassa (CDC 2009). Suomessa ensimmäinen viruksen aiheuttama sairaustapaus varmistui toukokuussa 2009, ja varsinainen epidemia käynnistyi lokakuussa 2009. Arviolta 10 % suomalaisista sairastui sikainfluenssaan, 1600 joutui sairaalahoitoon ja 44 heistä menehtyi. (Lyytikäinen ym. 2010; Lumio 2021.) Lähes kaikilla menehtyneillä oli taustalla jokin pitkäaikaissairaus, joka altisti heidät sikainfluenssan vakavalle tautimuodolle (Lyytikäinen ym. 2011). Maailmanlaajuisesti sikainfluenssapandemia aiheutti arviolta 151 000–575 000 kuolemaa (Dawood ym. 2012).

1.3.2 Influenssa A -viruksen aiheuttamat pandemian uhat

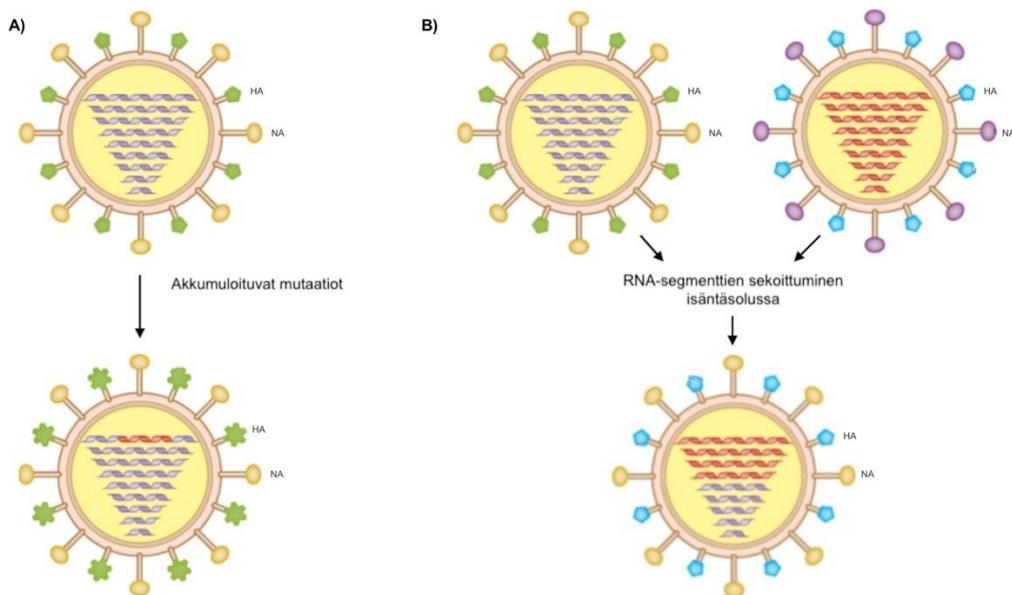
Viimeisen sadan vuoden aikana on ollut myös hetkiä, jolloin on pelätty uuden influenssa-pandemian alkavan. Esimerkiksi lintuinfluenssaviruksesta lähtevän pandemian alkua pelästyttiin hetkellisesti vuosina 1997 ja 1999, kun ensin IAV-alatyypin H5N1 ja sen jälkeen alatyypin H9N2 tarttui siipikarjasta ihmisiin aiheuttaen yksittäisiä tautitapauksia Kiinassa (CDC 1997; Peiris ym. 1999). Tartunnat jäivät kuitenkin paikallisiksi, koska nämä lintujen IAV:t eivät levinneet tehokkaasti ihmisestä toiseen. Edellä mainitut lintuinfluenssavirukset ovat vielä 1990- ja 2000-luvuillakin aiheuttaneet ihmisissä tartuntoja (CDC 2018; Song & Qin 2020). Tämän lisäksi lintujen IAV alatyypiltään H7N9 on viime vuosina noussut yhä kasvavaksi huolenaiheeksi sen aiheuttaessa Kiinassa toistuvia epidemioita ihmisissä (Zhou ym. 2020).

1.4. Influenssavirusten adaptaatio ja A/H1N1pdm09

1.4.1 Muuntelu influenssa A -viruksissa

Osa ihmisille uusien IAV-alatyypin aiheuttamista tartunnoista jää paikallisiksi yksittäistapauksiksi tai epidemioiksi, osan laajentuessa jopa miljoonia ihmisiä sairastuttaviksi pandemioiksi. Jotta pandemia puhkeaisi, täytyy lintuinfluenssaviruksen kyetä ensin infektoimaan sille uudentyyppinen isäntäsolu, jolloin se pystyy vaihtamaan isäntäeläintä linnusta ihmiseen. Tämän jälkeen lintuinfluenssaviruksen täytyy vielä adaptoitua uuteen isäntäsoluun eli kyetä replikoitumaan siinä tehokkaasti sekä tuottamaan suuria määriä infektiivisiä virioneja. Vasta näiden tapahtumien jälkeen on mahdollista, että tartuntaketjut etenevät nopeasti ihmisestä toiseen.

IAV:ten adaptoituminen ympäristöön aiheuttaa niille valintapainetta, minkä seurauksena IAV:issa ilmenee jatkuvasti uusia ominaisuuksia. IAV:ten muuntelu perustuu kahteen mekanismiin: pistemutaatioihin ja reassortointiin (kuva 6) (Mehle ym. 2012). Pistemutaatioita syntyy herkästi etenkin RNA-viruksilla. Tämä on seurausta RNA-polymeeraasientsyymin puuttuvasta oikolukukyvystä, mikä johtaa virheisiin virusgenomin replikaatiossa. (Sanjuán & Domingo-Calap 2016.) IAV:lla mutaatioita tapahtuu erityisen paljon ja niiden mutaatiotaajuus on selkeästi suurempi kuin influenssa B -viruksilla (Yamashita ym. 1988; Nobusawa & Sato 2006).



Kuva 6. IAV:issa tapahtuva muuntelu perustuu mutaatioihin (A) ja reassortatioon (B). A) IAV:t mukautuvat eli adaptoituvat jatkuvasti ympäristöönsä, mikä aiheuttaa niissä valintapainetta. Sen seurauksena IAV:issa tapahtuu muuntelua genomiin ajan myötä kertyvien mutaatioiden kautta. B) Reassortatio on toinen tapa, jolla IAV:issa tapahtuu muuntelua. Siinä kaksi tai useampi IAV infektoi solun yhtä aikaa, jolloin niiden genomisegmentit sekoittuvat ja yhdistyvät jälkeläisvirionissa uudenlaiseksi yhdistelmäksi. (Muokattu Chromscience 2020).

Reassortatio on segmentoituneen genomien omaaville viruksille ominainen muuntumistapa, vaikkakin sitä tapahtuu influenssaviruksilla pistemutaatioita harvemmin. Reassortatio johtaa ilmiöön nimeltä antigeeninen vaihdos (*engl.* antigenic shift), josta seuraa yleensä äkillisempiä muutoksia IAV:issa kuin mutaatioissa. Reassortatiossa solun samanaikaisesti infektoituneen kahden tai useamman IAV:n genomisegmentit sekoittuvat ja yhdistyvät uudenlaiseksi yhdistelmäksi solusta tuottuvaan jälkeläisvirioniin, joiden HA- ja NA-proteiinit voivat muuntua niin paljon, että virus luokitellaan kokonaan uudeksi IAV-alityypiksi. Espanjantautia lukuun ottamatta kaikki edellä esitellyistä pandemioidista olivat reassortation kautta muuntuneen IAV:n aiheuttamia. (Shao ym. 2017.) Kaikkien tällä hetkellä tunnettujen IAV-alityyppien tiedetään kiertävän vesilintujen keskuudessa, mikä muodostaa ehtymättömän reservin IAV:ia. Tämä reservi tarjoaa alustan uusien reassortanttivirusten muodostumiselle ja uusien pandemioiden syntymiselle, mikäli virukset pystyvät siirtymään ihmiseen. (Reperant ym. 2012; CDC 2015.)

Reassortatiossa tai mutaation kautta syntynyt IAV on ihmisen vastustuskyvyllä suurelta osin täysin uudenlainen virus, joten virusinfektio aiheuttaa isännässään voimakkaan immunireaktion ja virusvasta-aineiden muodostumisen. Viruksen tulee adaptoitua uuteen

isäntään, jotta virus ei ole liian patogeeninen. Jos virusinfektio johtaa tilanteeseen, jossa isäntäeläimen voimakkaat oireet vaikuttavat isäntäeläimen liikkumiseen, ei virus välttämättä leviä tehokkaasti väestössä. Sen vuoksi luonnonvalinnan ja mutaatioiden kautta virus adaptoituu ihmiseen, mikä näkyy replikaatiokyvyn tehostumisena sekä immuunireaktioiden välttelyn ja vaimentamisen kanssa tasapainotteluna. Näin virus ehtii infektoida uusia ihmisiä ennen viruksen tuhoutumista isäntäihmisen immuunipuolustuksen toimesta tai vaihtoehtoisesti isäntäihmisen menehtymistä. (Taubenberger & Kash 2010; Reperant ym. 2012.)

1.4.2 Influenssa A -viruksissa tapahtuvan adaptaation mekanismit

Viruksen adaptaatio kohdentuu moniin virusinfektion aikaisiin tapahtumiin. Viruksen leviämiseksi on oleellista väistää isännän puolustusjärjestelmä. IAV:n pintaproteiinit HA ja NA ovat antigeenejä, jotka isännän puolustusjärjestelmä tunnistaa ja indusoi vasteet. Tämä aiheuttaa valintapainetta, josta seuraa mutaatioita HA- ja NA-proteiineissa. Ilmiötä kutsutaan antigeeniseksi ajautumiseksi (*engl.* antigenic drift). (Carrat & Flahault 2007.)

Toinen tärkeä adaptaatiomekanismi on viruksen sitoutumiskyky solun pinnan molekyyliin. Ihmisen ylempien hengitysteiden epiteelisolut ilmentävät solukalvolla suurimaksi osaksi α -2,6-siaalihapposidosta, kun taas esimerkiksi linnut ilmentävät pääasiassa α -2,3-siaalihapposidosta. Kun sopiva mutaatio yhtäkkiä muuttaa HA:n sitoutumiskykyä siaalihapposidoksesta toiseen, saa lintujen influenssavirus kyvyn infektoida ihmisen hengitystiesoluja ja vaihtaa siten uuteen isäntäeläimeen. (Broszeit ym. 2019.) Lisäksi HA0-esiasteproteiinin täytyy olla sen tyyppinen, että se pilkkoutuu isäntäeläimen proteaasien toimesta HA1- ja HA2-alayksiköiksi, jotta se kykenee sitoutumaan solun pintareseptoreihin (Taubenberger 1998). Viruksen sitoutumisella solun pinnan reseptoreihin on vaikutusta myös uusien virionien solusta vapautumisessa. Esimerkiksi jos HA-proteiinin glykaanirakenne on muuttunut, täytyy myös NA-proteiinissa tapahtua muutoksia, jotta se pystyy katkaisemaan HA:n ja solun pinnan reseptorien väliset sidokset virionin kuroutuessa ulos solusta (Long ym. 2019).

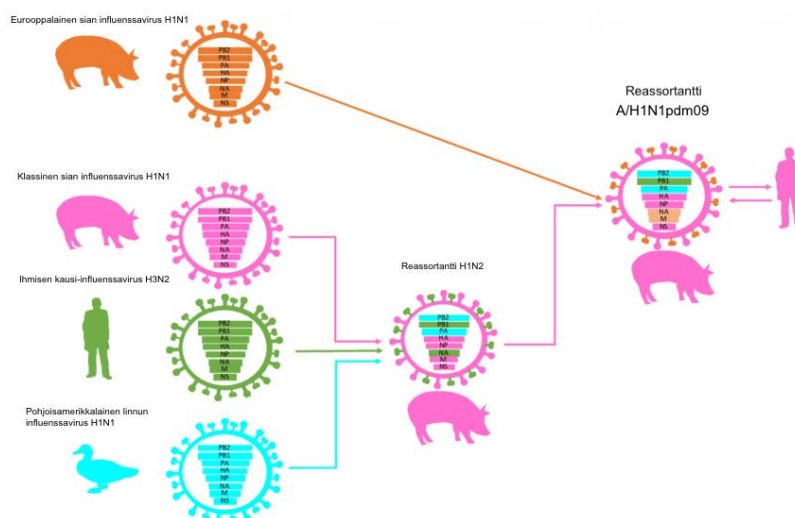
Lisäksi jotta uuden isäntäsolun infektio ei olisi viruksen elinkierron umpikuja, kuten vuosien 1997 ja 1999 lintuinfluenssatapauksissa, IAV:n täytyy kyetä myös replikoitumaan ja tuottamaan uusia viruspartikkeleja tehokkaasti uudessa isäntäsolussa. Viruksen replikaa-

tiokykyä tehostavat mutaatiot ovat yksi IAV:lle välttämätön adaptaatiomekanismi. Muutaatioita tapahtuu esimerkiksi RNA-polymeraasia ja luontaista immuunivastetta vaimentavia ei-rakenteellisia proteiineja koodaavissa geneeissä. (CDC 2018; WHO 2018a; Long ym. 2019.)

1.4.3 Influenssavirus A/H1N1/pdm09

IAV:ten reassortatiota tapahtuu usein sioissa, sillä niiden ylempien hengitysteiden epiteelisoluisissa ilmennyty sekä α -2,3 että α -2,6-siaalihapposidoksia. Tämä mahdollistaa useamman erilaisen IAV-alatyypin infektion samassa kudoksessa. (Shao ym. 2017.) Näin tapahtui myös vuoden 2009 sikainfluenssapandemian synnyssä; geneettisesti täysin uudenlainen H1N1 oli seurausta kahdesta erillisestä siassa tapahtuneesta reassortatiotapahtumasta (kuva 7).

Ensimmäisessä reassortatiotapahtumassa sian oli infektoinut samaan aikaan niin sanottu klassinen sikainfluenssavirus H1N1, pohjoisamerikkalaisen kehityslinjan lintuinfluenssavirus H1N1 ja ihmisen kausi-influenssavirus H3N2, mistä tuloksena syntyi kolmoisreassortanttivirus H1N2. Vuosia myöhemmin H1N2 sattui infektoimaan sian samaan aikaan eurooppalaisen kehityslinjan lintuinfluenssankaltaisen sikainfluenssavirustyyppin H1N1:n kanssa, mistä reassortation seurauksena syntyi vuoden 2009 pandemian aiheuttanut sikainfluenssavirus H1N1. Vuonna 2009 muodostuneesta sikainfluenssa-alatyypistä ja sen jälkeläisviruksista käytetään nimitystä A/H1N1pdm09.



Kuva 7. Vuoden 2009 sikainfluenssapandemian aiheuttaneen IAV/H1N1:n syntymiseen johtaneet kaksi erillistä reassortatiotapahtumaa. Ensimmäisessä reassortatiotapahtumassa siassa yhdistyi kolme eri isäntäeläimestä peräisin olevaa IAV-alatyyp-

piä, mikä johti kolmoisreassortantivirus H1N2:n muodostumiseen. Toisessa reassortatiotapahtumassa H1N2 muodosti euraasian sikainfluenssaviruksen kanssa jälkeläisviruksena vuoden 2009 sikainfluenssapandemian aiheuttaneen A/H1N1pdm09-viruksen. (Muokattu Mancera Gracia 2017).

Tämän uuden virusvariantin HA oli perua klassiselta sikainfluenssavirukselta, joka oli vuoden 1918 espanjantaudin suora jälkeläinen. Kyseinen HA kykeni sitoutumaan tehokkaasti ihmisen hengitysteiden soluihin, mutta oli kuitenkin niin erilainen aiempiin kausi-influenssaa aiheuttaneisiin H1N1-viruksiin verrattuna, ettei espanjantaudin kokemattomilla ihmisillä ollut immuniteettia sitä vastaan. Tämä mahdollisti uuden IAV-alatyypin aiheuttaman maailmanlaajuisen pandemian. (Dawood ym. 2009; Elderfield ym. 2014.)

1.5 Tutkimuksen tarkoitus ja tutkimuskysymys

IAV-alatyypin A/H1N1pdm09 on sikainfluenssapandemian jälkeen vuodesta toiseen jatkanut adaptoitumistaan ja evolutiivista kilpajuoksuaan ihmisten muodostamaa immuniteettia vastaan. Virus on jäänyt kiertämään maailmaa yhtenä kausi-influenssaviruksena, aiheuttaen samalla vuotuisia influenssaepidemioita (Shao ym. 2017).

Elderfield ym. (2014) tekemässä tutkimuksessa havaittiin, että Yhdistyneessä kuningaskunnassa kiertäneessä A/H1N1pdm09-viruksessa oli sikainfluenssapandemian kolmen aallon aikana vuosina 2009–2011 välillä tapahtunut ihmiseen adaptoivia mutaatioita, jotka johtivat viruksen replikaatiokyvyn tehostumiseen. Adaptaatiomekanismeja ei kuitenkaan tunneta vielä kovin hyvin.

Edellä esitettyjen taustatietojen perusteella muodostuu tämän työn tutkimuskysymys: onko A/H1N1pdm09-viruksen replikaatiokyvyssä havaittavissa muutoksia näiden reilun kymmenen vuoden aikana viruksen ilmaantumisen jälkeen? Hypoteesina on, että joistain, ellei kaikista, tutkittavista kannoista löytyy työssä käytettävillä menetelmillä mitattavia eroja. Tutkimuksen tarkoituksena on antaa suuntaa tarkempien adaptaatiomekanismien selvittämiseen tähtääville jatkotutkimuksille, joissa tullaan selvittämään viruksen adaptaatiota ja sen mekanismeja.

2. AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Solulinjat ja soluviljely

Työssä käytettiin kolmea eri solulinjaa eli Madin-Darbyn koiran munuaisepiteelisoluja (*engl.* Madin-Darby Canine Kidney, MDCK), Vero E6 vihermarakatin munuaisepiteelisoluja sekä A549 ihmisen keuhkojen adenokarsinoomasoluja. Kaikki työssä käytetyt solulinjat saatiin Turun yliopiston biolääketieteen laitoksen solukokoelmista. Solulinjoja ylläpidettiin soluviljelypulloissa +37 °C:n lämpötilassa ja 5 % CO₂-pitoisuudessa. Solujen kasvatusmediumina käytettiin DMEM:iä (Lonza), joka sisälsi 10 % lämpöinaktivoitua FBS:ää (Gibco), 1 % P/S-antibioottiseosta (Lonza) sekä 1 % Glutamaxia (Gibco). Soluja siirrostettaessa ne pestiin PBS:llä (HyClone) ja irrottamiseen kasvatusalustasta käytettiin 0,25 % trypsiini-EDTA-liuosta (Lonza).

2.2 Influenssa A -virusten eristys ja kasvatus

Työssä eristettiin ja kasvatettiin IAV-kannat vuoden 2020 influenssakaudella kerätyistä seitsemästä IAV-positiivisesta potilasnäytteestä, jotka saatiin Turun yliopistollisen sairaalan kliinisen mikrobiologian laboratoriosta (kuva 8A). Näytetikut oli näytteenoton jälkeen säilytetty universaalia siirtoliuosta (UTM-liuos) sisältävissä viruskuljetusputkissa.

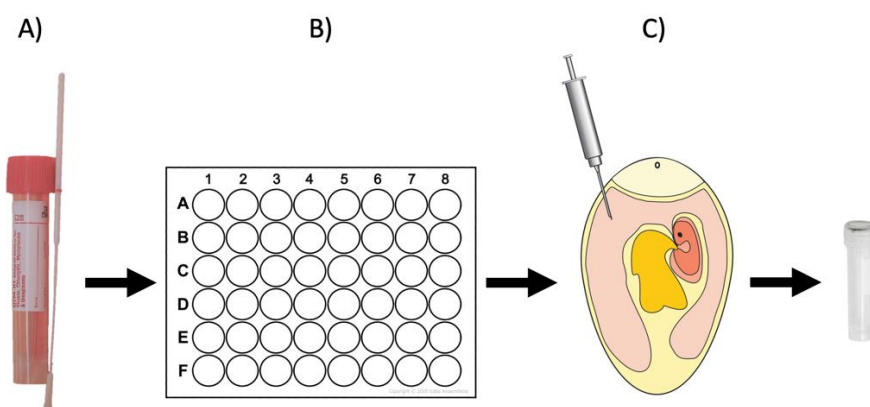
IAV-kantojen kasvatusta varten MDCK-solut siirrostettiin 48-kuoppalevyille ja ne infektoitiin, kun solut olivat saavuttaneet 70–80 % konfluenttisuuden (kuva 8B). Solut pestiin kaksi kertaa PBS:llä ja niille lisättiin mediumia 250 µl/kuoppa sekä potilasnäytettä 50 µl/kuoppa. Tämän ensimmäisen siirrostuksen jälkeen viruskasvatuksia siirrostettiin vielä kaksi kertaa siirtämällä viruskasvatusta 50 µl/kuoppa uudelle MDCK-soluja sisältävälle 48-kuoppalevyille, jolle lisättiin tämän jälkeen myös mediumia 250 µl/kuoppa. Viruskasvatuksissa käytettiin DMEM-mediumia (Lonza), johon oli lisätty 0,2 % BSA:ta (Sigma-Aldrich), 1 % Glutamaxia (Gibco), 1 % P/S-antibioottiseosta (Lonza) ja 0,2 % TPCK-trypsiiniä (Sigma-Aldrich).

Jokaisella siirrostuskerralla viruskasvatuksia inkuboitiin 72–96 h (+37 °C, 5 % CO₂). Inkubaatioiden aikana soluja mikroskopoitiin päivittäin ja kun soluissa havaittiin sytopaat-

tininen efekti eli solujen joukkokuolema, todettiin virusten monistuneen tarpeeksi ja kasvatuksat kerättiin. Kuolleet solut poistettiin sentrifugaatiolla (10 min, 500 rcf). Ne viruskasvatukset, jotka eivät vielä kolmannella siirrostuskerrallakaan aiheuttaneet soluissa sytopaattista efektiä, luokiteltiin negatiivisiksi eikä niiden kasvatusta jatkettu.

Soluilla tehdyn kasvatuksen jälkeen sytopaattisen vaikutuksen aikaansaaneiden IAV-kasvatusten volyymia ja viruspitoisuutta eli tiitteriä lisättiin jatkokasvattamalla viruksia hedelmöittyneissä kananmunissa (kuva 8C). Kananmunat tilattiin LSK Poultry Oy:ltä. Munat inkuboitiin 11 päivää luonnollisia haudontaolosuhteita imitoivassa kasvatuskaapissa (Brinsea, Ova-Easy 380 Advance Series II Cabinet Incubator, +37,6 °C, ilmankosteus 30–45 %), ja kananmunia tarkasteltiin päivittäin läpivalaisulla. Ne munat, joissa ei näkynyt normaalia sikiönkehitystä, hylättiin elinkelvottomina.

Inkubaation jälkeen muniin injektoitiin MDCK-soluissa tehdyt viruskasvatukset. Viruskasvatukset laimennettiin PBS:llä (HyClone) laimennossuhteella 1:500 ja laimennoksiin lisättiin 1 % P/S-antibioottiseosta (Lonza). Ilmataskun ja sikiön sijainti munassa havainnoitiin läpivalaisulla ja sijainnit merkittiin munan kuoreen. Kananmunan kuoreen tehtiin kaksi pientä reikää, toinen sikiön vastapuolelle ja toinen ilmataskun kohdalle. Tämän jälkeen viruslaimennosta injektoitiin allantoisnesteeseen sikiön vastapuolelle tehdyn reiän kautta (noin 200 µl/muna) varoen pistämästä sikiötä. Kananmunaan lisätyn nesteen aiheuttama paine pääsi poistumaan ilmataskuun tehdyn reiän kautta. Injektion jälkeen kuoreen tehdyt reiät suljettiin pisaralla myrkytöntä liimaa.



Kuva 8. IAV:ten eristys ja kasvatus potilasnäytteestä. IAV:t eristettiin ja kasvatettiin IAV-positiivisista potilasnäytteistä (A) ensin 48-kuoppalevyillä (B), joilla kasvoi MDCK-soluja 70–80 % konfluenttisuudessa. Soluilla tehdyn kasvatuksen jälkeen näytteiden volyymia ja viruspitoisuutta eli tiitteriä lisättiin jatkokasvattamalla IAV:ia hedelmöittyneissä kananmunissa (C). (Muokattu Pathlab 2019; Spackman & Killian 2020)

Viruslaimennoksella injektoituja kananmunia inkuboitii kasvatuskaapissa kolme päivää (+37,6 °C, ilmankosteus 30–45 %). Inkubaation jälkeen kananmunat siirrettiin tunniksi pakkaseen (-20 °C), jolloin kananmunissa olevat verisuonet supistuivat ja munia oli siistimpi käsitellä. Näin myös varmistettiin, etteivät sikiöt ole enää elossa seuraavassa käsitelyvaiheessa. Kananmunat avattiin varovasti ilmataskun puolelta ja viruspitoinen allantoisneste kerättiin neulalla injektioruiskuun. Allantoisnesteen sisältämä sakka poistettiin sentrifugoimalla (500 rcf, 10 min), minkä jälkeen viruskasvatukset jaettiin pienempiin eriin ja pakastettiin (-80 °C). Kasvatusten tiitteri selvitettiin plakkititrausmenetelmällä (kappale 2.3).

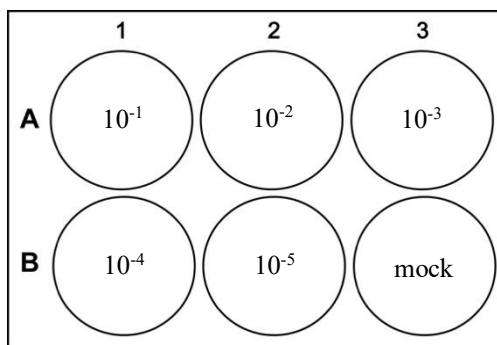
2.3 Plakkititraus

MDCK-solut kasvatettiin 6-kuoppalevyillä, kunnes solut olivat saavuttaneet 70–80 % konfluenttisuuden. Analysoitavista IAV-näytteistä tehtiin laimennossarjat 10^{-1} – 10^{-5} viruskasvatusmediumiin (DMEM (Lonza), 0,2 % BSA (Sigma-Aldrich), 1 % Glutamax (Gibco), 1 % P/S-antibioottiseos (Lonza), 0,2 % TPCK-trypsiini (Sigma-Aldrich) (Kuva 9).

Solut pestiin kahteen kertaan PBS:llä ja niille lisättiin IAV-näytelaimennosta tai negatiivista kontrollia 200 µl /kuoppa. Negatiivisena kontrollina toimi pelkkä viruskasvatusmedium ilman IAV-näytettä ja positiivisena kontrollina toimi omalla kuoppalevyllään plakkititrattu A/California/07/09(H1N1pdm09) -viruksen stokkikasvatus, jonka tiedettiin aiempien kokeiden perusteella tuottavan selkeän tuloksen. Kuoppalevyjä inkuboitii tunnin ajan (+37 °C, 5 % CO₂), minkä aikana kuoppalevyjä kallisteltiin kevyesti 15 minuutin välein solujen kuivumisen estämiseksi. Inkubaation jälkeen kuoppiin lisättiin 2 ml Avicel/MEM-liuosta (MEM (Sigma-Aldrich), 2,4 m-% Avicel (FMC BioPolymer) liuotettuna veteen, 0,2 % BSA (Sigma-Aldrich), 2 µg/ml TPCK-trypsiini (Sigma-Aldrich)). Soluja inkuboitii 72 h (+37 °C, 5 % CO₂).

Inkubaation jälkeen jokaiseen kuoppaan lisättiin 10 % fosfaattipuskuroitua formaliinia (FF-Chemicals) 5 ml/kuoppa, minkä jälkeen kuoppalevyjä inkuboitii huoneenlämmössä vähintään 30 minuuttia. Inkubaation jälkeen solut pestiin PBS:llä ja solut värjättiin lisäämällä kuopalle 1 ml kristalliviolettiliuosta (2,45 mM Crystal Violet (Merck), 3,6 % FA (VWR Chemicals), 1 % MetOH (VWR Chemicals), 20 % EtOH (Altia Industrial)). Soluja

inkuboitii väriliuoksessa tunnin ajan, minkä jälkeen kuopat huuhdeltiin vedellä ja niiden annettiin kuivua huoneenlämmössä.



Kuva 9. Plakkititrauksessa käytettyjen 6-kuoppalevyjen pipetointikaavio. Kuoppalevyille siirrostettiin MDCK-soluja ja ne infektoitiin 70–80 % konfluenttisuudessa viruskasvatusmediumiin sarjalaimennetulla (10^{-1} – 10^{-5}) IAV-näytteellä. Negatiivisena kontrollina (*engl.* mock) käytettiin pelkkää viruskasvatusmediumia ilman IAV-näytettä.

Plakkititrattujen näytteiden tulokset eli virusten tiitterit perustuvat kuopalla olevassa kristallivioletilla värjättyssä solumatossa näkyviin reikiin eli plakkeihin, jotka kuolleet solut ovat muodostaneet irrotessaan kuopan pohjasta. Kun virus infektoi solun, kuolee solu lopulta, solussa tuottuneiden infektiokykyisten uusien virioneiden samalla edeten solumatossa viereisiin soluihin ja tuhoten yhä enemmän soluja. IAV-näytteen tiitteri (PFU/ml) määritettiin laskemalla kuopilla oleviin värjättyihin solumattoihin muodostuneet reiät eli plakit ja käyttämällä seuraavaa kaavaa:

$$PFU/ml = \frac{\text{plakkien määrä}}{\text{laimennos} \times \text{lisätyn näytteen volyyymi}}$$

Infektiokokeita analysoitaessa laskukaavasta saadut muilla IAV-kannoilla tehtyjen infektiokokeiden kasvatusmedium-näytteiden plakkititrausten luvut suhteutettiin kannalla '09C tehdyn infektiokokeen kasvatusmedium-näytteen plakkititrauksesta saatuun lukuun.

2.4 Influenssa A -viruskannat

Työssä käytetyt yhdeksän IAV-kantaa olivat peräisin seitsemältä eri influenssakaudelta (taulukko 1). Vuosien 1998–1999 sekä 2009–2019 influenssakausien viruskannat oli eristetty ja kasvatettu edellä kuvatuilla menetelmillä Ilkka Julkusen tutkimusryhmässä jo ennen tämän työn aloitusta. Influenssakauden 2019–2020 kahdesta IAV-kannasta jälkim-

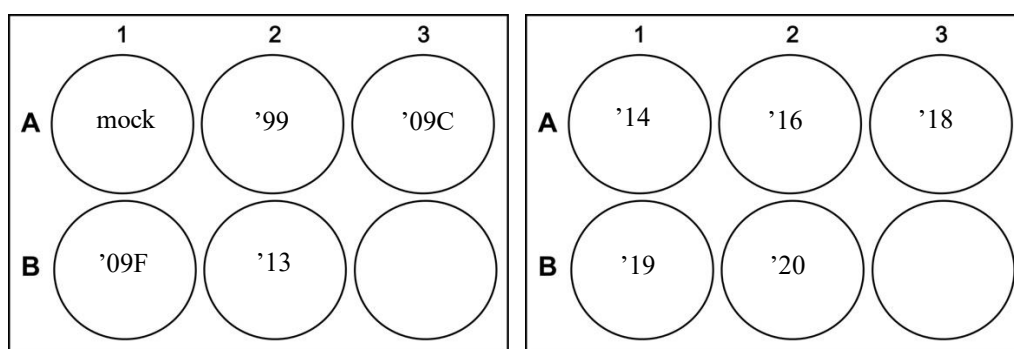
mäinen kasvatettiin osana tätä työtä. Pandeeminen sikainfluenssavirus ilmaantui influenssakaudella 2009–2010. Työssä käytettiin tältä influenssakaudelta kahta eri viruskanta: toinen oli eristetty kalifornialaiselta ja toinen suomalaiselta potilaalta. Tämän tutkimuksen vertailukohde oli kaliforniassa eristetty viruskanta ('09C). Kontrollikannaksi valittiin influenssakauden 1998–1999 IAV-kanta ('99), joka on ennen sikainfluenssapandemiaa käytetty rokoteviruskanta. Tämä kanta edustaa eri H1N1:n fylogeneettistä haaraa kuin A/H1N1pdm09-kannat. Muiden influenssakausien kannat valittiin mahdollisimman tasaisin vuosivälein sen mukaan, mitä viruskantoja oli saatavilla.

Taulukko 1. Työssä käytetyt yhdeksän IAV-kantaa ja niiden lyhenne, influenssakausi, jolloin kannat kiersivät sekä kantojen kasvatusvuosi ja tiitteri. Influenssakauden 1998–1999 sekä vuosien 2009–2019 influenssakausien IAV-kannat oli valmiiksi kasvatettu ennen tämän työn aloitusta. Influenssakauden 2019–2020 jälkimmäinen IAV-kanta kasvatettiin osana tätä työtä. Influenssakaudella 2009–2010 ja sen jälkeen kiertäneistä IAV-kannoista käytetään nimitystä H1N1pdm09. Taulukossa lyhenteellä '09C tarkoitetaan influenssakaudella 2009–2010 Kaliforniassa eristettyä näytettä ja lyhenteellä '09F tarkoitetaan samalla influenssakaudella Suomessa eristettyä näytettä. Muiden kantojen kohdalla niistä käytetään viruksen eristysvuoden lyhennettä. Kantojen tiitterit (PFU/ml) on laskettu plakkititrausmenetelmällä (kappale 2.3).

IAV-kanta	Lyhenne	Influenssakausi	Kasvatusvuosi	Tiitteri (PFU/ml)
A/New Caledonia/20/99(H1N1)	'99	1998–1999	2014	1,15x10 ⁸
A/California/07/09(H1N1pdm09)	'09C	2009–2010	2015	6,00x10 ⁷
A/Finland/554/09(H1N1pdm09)	'09F	2009–2010	2014	1,15x10 ⁷
A/Finland/1614/13(H1N1pdm09)	'13	2012–2013	2019	7,50x10 ⁶
A/Turku/42/14(H1N1pdm09)	'14	2013–2014	2014	1,50x10 ⁷
A/Turku/577/16(H1N1pdm09)	'16	2015–2016	2019	5,60x10 ⁷
A/Turku/822/18(H1N1pdm09)	'18	2017–2018	2019	3,25x10 ⁷
A/Turku/107/19(H1N1pdm09)	'19	2019–2020	2019	1,00x10 ⁸
A/Turku/124/20(H1N1pdm09)	'20	2019–2020	2020	3,25x10 ⁶

2.5 Infektiokokeet

Infektiokokeet tehtiin 6-kuoppalevyillä, joille oli siirrostettu MDCK-, Vero E6- tai A549-soluja (7×10^5 solua/kuoppa). Infektiokoetoistoja tehtiin kolme jokaisella solulinjalla. MDCK-soluilla tehdyissä infektioiden kasvatusmediumina käytettiin vastaavaa liuosta kuin viruskantojen kasvatuksessa. Tästä poiketen Vero E6- sekä A549-solujen infektioiden käytetyn kasvatusmediumin TPCK-trypsiinipitoisuus oli 0,025 %. Solut infektoitiin yhdellä IAV-kannalla/kuoppa (kuva 10). Kokeessa oli mukana negatiivinen kontrollikuoppa, johon ei lisätty virusta. Infektiokokeessa tehtiin kaksi keskenään identtistä kuoppalevyä, toinen 24 tunnin ja toinen 48 tunnin kasvatusta varten.



Kuva 10. Infektiokokeissa käytettyjen 6-kuoppalevyjen pipetointikaavio. Kuoppalevyille siirrostetut MDCK-, A549- tai Vero E6 -solut (7×10^5 solua/kuoppa) infektoitiin yhdeksällä eri IAV-kannalla (MOI 0,1, taulukko 1). Yhteen kuoppaan ei lisätty virusta ja se toimi infektion negatiivisena kontrollina (*engl.* mock).

Solut pestiin kahteen kertaan PBS:llä, minkä jälkeen kuoppiin lisättiin kutakin viruskanta sen tiitterin mukaisesti niin, että MOI-luvuksi tuli 0,1 sekä kasvatusmediumia niin, että yhteistilavuudeksi tuli 250 μ l/kuoppa. Kuoppalevyjä inkuboitettiin 1 h ajan (+37 °C, 5 % CO₂), minkä aikana levyjä kallisteltiin kevyesti 15 minuutin välein solujen kuivumisen estämiseksi. Inkubaation jälkeen solut pestiin kahteen kertaan PBS:llä ja kuoppiin lisättiin 1 ml kasvatusmediumia. IAV-kannan A/California/07/09(H1N1pdm09) sisältävästä näytekuopasta otettiin talteen 100 μ l kasvatusmediumia, joka pakastettiin (-80 °C) myöhemmin tehtävää RT-qPCR-analyysiä varten (kappale 2.7). Soluja inkuboitettiin 24 h ja 48 tuntia (+37 °C, 5 % CO₂).

Kasvatusmedium ja solut kerättiin kuoppalevyiltä molemmissa aikapisteissä. Kasvatusmediumista pelletoitettiin kuolleet solut (500 rcf, 10 min) ja supernatantti jaettiin kahteen mikrosentrifuugiputkeen. Solupelletin päältä pipetoitiin neste mahdollisimman tarkasti

pois. Kuoppalevyllä olevien solujen päälle lisättiin 150 µl 1X lyysispuskuria (Promega), johon oli lisätty 1X proteaasi-inhibiittoriseosta (Pierce). Solut kerättiin samoihin mikrosentrifuugiputkiin, joihin kuolleet solut oli pelletoitu. Kaikki kerätyt näytteet pakastettiin (−80 °C). Solulysaatit analysoitiin immunoblottauksella (kappale 2.6) ja kasvatusmedium analysoitiin RT-qPCR- (kappale 2.7) sekä plakkitiraus-menetelmillä (kappale 2.3).

2.6 Immunoblottaus

Infektiokokeista kerättyjen solunäytteiden NP- ja M1-proteiiniekspressiota analysoitiin Western Blot -immunoblottausmenetelmällä. Proteiinit eroteltiin SDS-PAGE-menetelmällä. Solulysaatteihin lisättiin SDS-latauspuskuria (0,25 M Tris-HCl (BioRad), 15 % SDS (Merck), 50 % glyseroli (Sigma-Aldrich), 25 % β-ME (Sigma-Aldrich), 0,01 % bro-mofenolisinen (Merck)) laimennossuhteella 1:5, ja näytteet kuumennettiin (5 min, +95 °C), minkä jälkeen näytteet sekä molekyylipainomarkkeri (Chameleon Duo, LI-COR Biosciences) ajettiin Mini-PROTEAN TGX Any kD -polyakryyliamidigeeleille (BioRad) SDS-ajopuskuriliuoksessa ((BioRad) 180 V, 45–60 min). Erotellut proteiinit siirrostettiin puolikuivalla menetelmällä 0,2 µm nitroselluloosakalvoille ((Amersham) 12 V, 30 min) siirtopuskuriliuoksessa (25 mM Tris-emäs (BioRad), 192 mM glysiini (Sigma-Aldrich), 20 % MetOH (VWR Chemicals)). Siirtoajon jälkeen kalvoja inkuboitui vähintään yhden tunnin ajan TBST-liuoksessa (150 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 10 mM Tris-HCl (BioRad), 0,1 % Tween 20 (GBiosciences)), johon oli liuotettu 5 m-% rasvatonta maitojauhetta (Valio).

Inkubaation jälkeen membraanit pestiin kolmesti TBST:llä 10 minuutin ajan. Kalvot vasta-ainevärjättiin ensin primääriavasta-aineilla, jotka oli lisätty 5 % maito-TBST:hen (hiiressä tuotettu α-GAPDH (Santa Cruz) laimennossuhteella 1:1000, kanissa tuotettu α-M1 (THL) laimennossuhteella 1:500, kanissa tuotettu α-NP (THL) laimennossuhteella 1:500) ja annettiin inkuboitua huoneenlämmössä yhden tunnin ajan. Sen jälkeen kalvot pestiin kolmesti TBST:llä ja membraaneille lisättiin sekundääriavasta-aineet 5 % maito-TBST-liuoksessa (IRDye 800CW vuohessa tuotettu α-hiiri (LI-COR Biosciences) laimennossuhteella 1:15 000, IRDye 680CW vuohessa tuotettu α-kani (LI-COR Biosciences) laimennossuhteella 1:15 000) ja annettiin inkuboitua yhden tunnin ajan huoneenlämmössä ja valolta suojattuna. Tämän jälkeen kalvot pestiin jälleen kolmesti TBST:llä. Lopuksi kalvot kuvattiin Image Studio -ohjelmalla (LI-COR Biosciences), minkä jälkeen

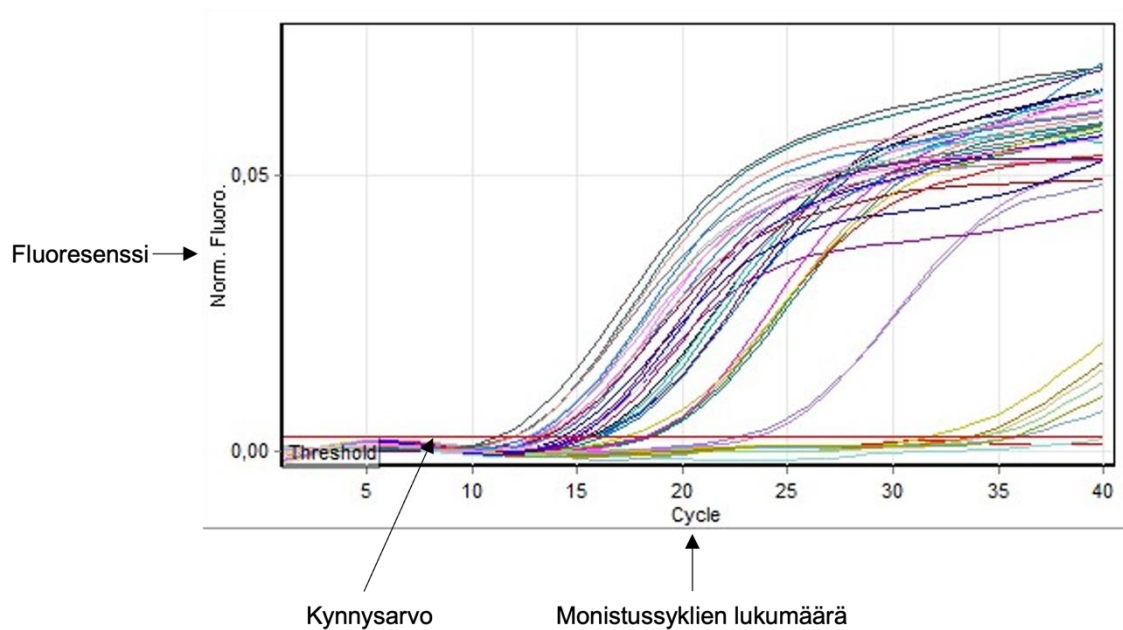
signaalien intensiteetit kvantitoitiin ImageJ-ohjelmalla. Signaalien intensiteetit normalisoitiin saman näytteen GAPDH-vasta-aineen antaman intensiteetin perusteella. Käytettyjen IAV-kantojen (taulukko 1) sekä mock-näytteen normalisoidut arvot suhteutettiin vielä IAV-kannan 39C arvoihin 24 tunnin aikapisteessä.

Solujen ekspressoimien NP:n ja M1-proteiinien määrien välisten erojen tilastollista merkittävyyttä mitattiin ensin yksisuuntaisella varianssianalyysillä (ANOVA). Seuraavaksi varianssianalyysin läpäisseet ($P < 0,05$) näyteryhmät analysoitiin Dunnettin post hoc -testillä. Lisäksi erojen tilastollista merkittävyyttä mitattiin kaksisuuntaisilla kahden toisistaan riippumattoman otoksen Studentin t-testeillä.

2.7 Kvantitatiivinen käänteistranskriptaasi-PCR eli RT-qPCR

IAV:illa infektoidujen solujen kasvatusmediumiin tuottunutta vRNA:n määrää mitattiin kvantitatiivisella käänteistranskriptaasi-PCR:llä eli RT-qPCR:llä. Infektiokokeista kerätyille supernatanteille (100 µl) tehtiin RNA-eristys RNeasy Plus Mini Kitillä (Qiagen) kitin ohjeen mukaisesti. Lopuksi RNA-näytteet pakastettiin (-80 °C). Ennen RT-qPCR:ää RNA-näytteet sulatettiin jäällä ja tehtiin yksivaiheiselle RT-qPCR:lle optimoitu reaktioseos, joka sisälsi sense-alukkeet (0,2 uM AM1s3 (Metabion)), antisense-alukkeet (0,2 uM AM1a1 (Metabion)), IAV:n M1-geenille spesifiset FAM-koettimet (0,2 uM (Metabion)), mastermix-seoksen (1X PrimeDirect Probe RT-qPCR Mix (Takara)) sekä vettä lopputilavuuteen. Reaktioseokseen lisättiin RNA-näyte (1:10) tai samassa suhteessa vesi, joka toimi menetelmän kontrollinäytteenä. Näytteet ajettiin RT-qPCR-sykliohjelmalla (Rotor-Gene Q, 1x käänteistranskriptio: +55 °C 10 min, denaturaatio +95 °C 15 sek ja 40x amplifikaatio: +95 °C 5 sek, +60 °C 30 sek), jonka aikana koettimen emittoimaa fluoresenssia mitattiin reaaliaikaisesti (kuva 11).

RT-qPCR-ajon jälkeen signaaleille asetettiin manuaalisesti kynnysarvo, jotta saatiin signaalikohtainen Ct-arvo eli se monistussyklien lukumäärä, jossa RNA-kopioiden määrä lähti eksponentiaalisesti kasvamaan. Siten Ct-arvo oli sitä pienempi, mitä enemmän näyte lähtökohtaisesti sisälsi vRNA:ta.



Kuva 11. Esimerkkikuva RT-qPCR-syklilaitteen sisältämän ohjelman (Rotor-Gene Q) visualisoimasta RNA:n määrästä näytteissä. RT-qPCR-syklilaitte mittaa ja visualisoi reaaliaikaisesti RNA-sekvenssiin sitoutuvan koettimen emittoimaa fluoresenssisignaalia. RNA-kopioiden määrän eksponentiaaliseen kasvuun vaadittavaa syklien määrää kuvataan Ct-arvolla, joka saadaan asettamalla signaaleille manuaalinen kynnysarvo. RNA-kopioiden määrä lähtee kasvamaan eksponentiaalisesti sitä pienemmällä Ct-arvolla, mitä enemmän näyte lähtökohtaisesti sisältää RNA:ta.

Jotta Ct-arvojen vertailuun tavallisimmin käytetty metodi ($\Delta\Delta\text{CT}$) olisi validi, tulisi mukana olla sisäinen kontrolli eli tässä tapauksessa solussa virusinfektiosta riippumattomasti ekspressoituva geeni. Koska solujen ulkopuolelta ei tällaista kontrolligeeniä voi detektoida, tässä tutkimuksessa RT-qPCR-tulosten analysointiin käytettiin ΔCt -arvoa. Jokaiselle RNA-näytteelle laskettiin ΔCt -arvo suhteuttamalla kyseisen näytteen Ct-arvo IAV-kannalla '09C tehtyjen, 24 tunnin aikapisteessä kerättyjen infektiokoetoistojen Ct-arvojen keskiarvoon. Tämän jälkeen ΔCt -arvot suhteutettiin vielä kannalla '09C tehtyjen, 24 tunnin aikapisteessä kerättyjen infektiokoetoistojen ΔCt -arvoihin.

Muilla IAV-kannoilla (taulukko 1) ja kannalla '09C infektoidujen solujen tuottaman vRNA:n määrien välisten erojen tilastollista merkittävyyttä mitattiin ensin yksisuuntaisella varianssianalyysillä (ANOVA). Varianssianalyysin läpäisseet ($P < 0,05$) näyteryhmät analysoitiin Dunnettin post hoc -testillä.

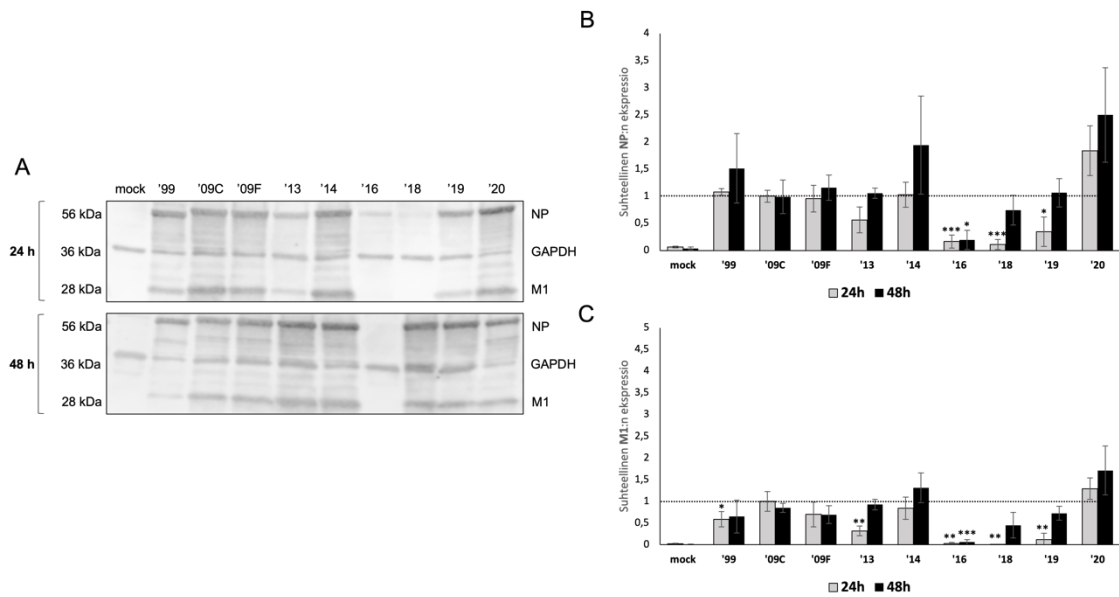
3. TULOKSET

Tässä työssä tutkittiin, onko maailmanlaajuisen pandemian influenssakaudella 2009–2010 aiheuttaneessa influenssa A -viruksen (IAV) A/H1N1pdm09:n replikaatiokyvyssä tapahtunut muutoksia kuluneen reilun kymmenen vuoden aikana. Muutoksia havainnoitiin infektoimalla MDCK-, A549- sekä Vero E6 -soluja yhdeksällä eri IAV-kannalla, jotka kiersivät influenssakaudella 1998–1999 (yksi kanta) tai vuosien 2009 ja 2020 välillä (kahdeksan kantaa) (taulukko 1). Influenssakauden 2019–2020 kahdesta käytetystä IAV-kannasta jälkimmäinen (kanta '20) eristettiin potilasnäytteestä ja kasvatettiin ensin MDCK-soluilla ja sitten kananmunissa osana tätä työtä. Kaikkiaan seitsemästä potilasnäytteestä eristetystä IAV-kannasta yksi IAV-kanta saatiin monistumaan tarpeeksi niin, että sen tiitteriksi saatiin plakkititrauksen perusteella yli 1×10^5 PFU/ml, jolloin sitä voitiin käyttää infektiokokeissa.

Infektiokokeista kerättiin sekä solut että kasvatusmedium 24 ja 48 tunnin aikapisteissä. Solulysaatit ja kasvatusmedium analysoitiin yhteensä kolmella eri menetelmällä, joilla havainnoitiin virusten replikaatiosyklin eri vaiheita infektoiduissa soluissa. Immunoblotauksella tarkasteltiin soluissa transloitujen IAV-proteiinin määriä, RT-qPCR:llä mitattiin solujen ulkopuolisen vRNA:n määrää ja plakkititrauksella kasvatusmediumista määritettiin solujen tuottamaa infektiokykyisten uusien virionien määrää. Jokaisessa edellä mainitussa menetelmässä saadut tulokset suhteutettiin lukuihin, jotka saatiin influenssakaudella 2009–2010 Kaliforniassa kiertäneellä pandeemisella IAV-kannalla ('09C) tehdyistä infektiosta 24 tunnin aikapisteessä.

3.1 Influenssa A -virusproteiinien ekspressio

IAV:illa infektoiduissa soluissa ekspressoitujen NP:n sekä M1-proteiinien määrä analysoitiin immunoblotauksella. Näytteiden latauskontrollina käytettiin solussa IAV-infektiosta riippumattomasti ekspressoituvaa GAPDH-proteiinia, joka on yksi solun niin kutsutuista ylläpitoproteiineista. Negatiivisena kontrollina (*engl.* mock) käytettiin infektoimattomia soluja. Tulokset jaettiin molemmissa aikapisteissä (24 tai 48 tuntia infektiosta) kolmeen ryhmään: niihin, joilla infektoituina solut ekspressoivat proteiinia yhtä paljon, enemmän tai vähemmän kuin IAV-kannalla '09C infektoituina 24 tunnin aikapisteessä.



Kuva 12. IAV:n NP:n ja M1-proteiinin ekspressio MDCK-soluissa. A) Yhdeksällä eri IAV-kannalla (taulukko 1) infektoiduissa MDCK-soluissa ekspressoituvat IAV-proteiinit NP ja M1 sekä solun ylläpitoproteiini GAPDH näkyvät proteiinitaivoina vasta-ainevärjätyillä nitroselluloosakalvoilla sekä 24 tunnin että 48 tunnin aikapisteissä. B) NP- sekä C) M1-proteiinitaivoinen keskiarvot ja keskihajonta (n=3) havainnollistettuna kuvaajamuodossa. Kuvaajissa NP:n ja M1-proteiinin intensiteettiä on ensin normalisoitu GAPDH:n intensiteettiä, minkä jälkeen muiden IAV-kantojen sekä mock-näytteen normalisoidut arvot on suhteutettu IAV-kannan '09C arvoihin 24 tunnin aikapisteessä. Muiden IAV-kantojen ja kannan '09C (24 h) välisten erojen tilastollista merkittävyyttä mitattiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä (ANOVA) ja Dunnettin post hoc -testillä. Erojen tilastollista merkittävyyttä mitattiin lisäksi kaksisuuntaisella kahden toisistaan riippumattoman otoksen Studentin t-testeillä. * P<0,05, ** P<0,01, *** P <0,001.

Immunoblottaustulokset osoittavat, että 24 tunnin kohdalla seitsemän yhdeksästä ja 48 tunnin kohdalla kahdeksan yhdeksästä IAV-kannalla infektoidusta MDCK-solunäytteestä ekspressoitui NP:a (kuva 12A). NP-ekspression jäädessä heikoksi '16-kannan kohdalla molemmissa aikapisteissä, '18-kannalla infektoidut solut tuottivat immunoblottauskokeissa havaittavaa NP:a 48 tunnin kohdalla (kuva 12A). Kuten NP-ekspression kohdalla, myös M1-ekspressio on havaittavissa 24 tunnin kohdalla seitsemässä yhdeksästä ja 48 tunnin kohdalla kahdeksassa yhdeksästä IAV-kannalla infektoidussa MDCK-solunäytteestä (kuva 12A). NP-tuloksia mukaillen kannan '16 kohdalla infektoijan kasvattaminen 24 tunnista 48 tuntiin ei nostanut M1-ekspressiota havaittavalle tasolle (kuva 12A).

Verrattuna IAV-kannalla '09C infektoituihin soluihin, IAV-kannoilla '99, '09F ja '14 infektoidut solut ekspressoivat NP:a 24 tunnin kohdalla lähes yhtä vahvasti (kuvat 12A ja B). Kannalla '20 infektoitujen solujen NP-ekspressio oli 24 tunnin aikapisteessä lähes kaksi kertaa voimakkaampaa verrattuna kannalla '09C infektoituihin soluihin. Kannoilla

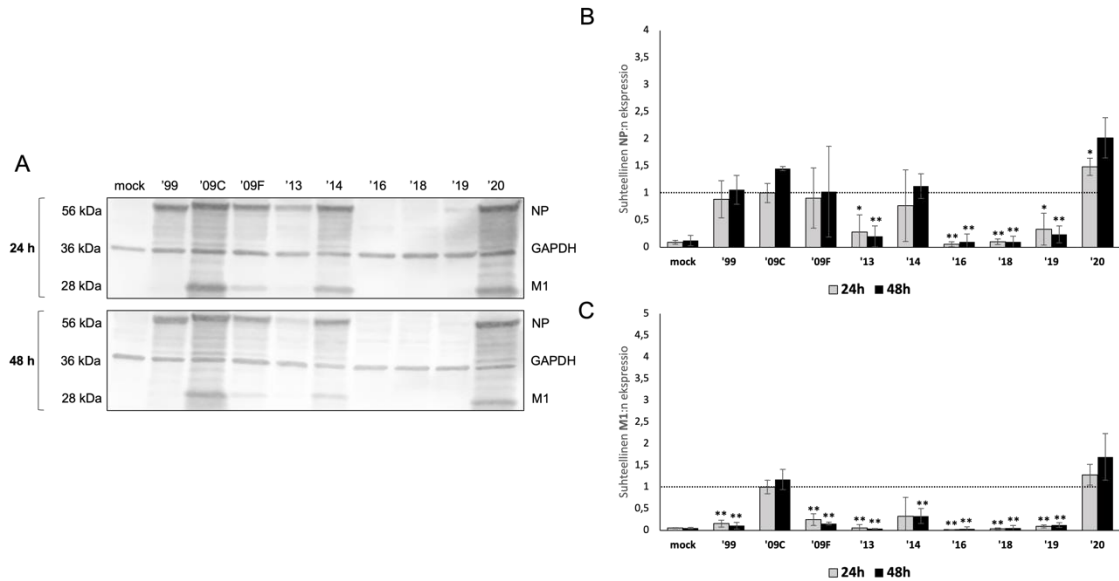
'13, '16, '18 ja '19 infektoidut solut sen sijaan ekspressoivat samassa aikapisteessä NP:a selkeästi kannalla '09C infektoituja soluja heikommin.

Kannoilla '13, '18 ja '19 infektoitujen solujen NP-ekspressio nousi 48 tunnin kohdalla samalle tasolle tai hieman korkeammalle kuin kannalla '09C infektoitujen solujen ekspressio 24 tunnin aikapisteessä (kuvat 12A ja B). Kannan '09C NP-ekspressio ei noussut keskimääräisesti ollenkaan 24 tunnin ja 48 tunnin aikapisteiden välillä. Kantojen '99 ja '09F NP-ekspressio nousi 48 tunnin kohdalla verrattuna 24 tunnin aikapisteeseen. Samoja aikapisteitä verrattaessa kannan '14 NP-ekspressio nousi huomattavasti. Verrattuna kantaan '09C 24 tunnin aikapisteessä kantojen '99 ja '14 NP:n ekspressio nousi 48 tunnin aikapisteessä selkeästi korkeammaksi ja kannan '09F NP-ekspressio hieman korkeammaksi. Myös kannan '20 NP-ekspressio nousi selkeästi 48 tunnin kohdalla verrattuna 24 tunnin aikapisteeseen, ekspression nousten 48 tunnin aikapisteessä jopa lähes kolminkertaiseksi verrattuna kannan '09C NP-ekspressioon 24 tunnin aikapisteessä.

Verrattuna kantaan '09C M1-proteiinin ekspressio oli selkeästi matalampaa IAV-kannoilla '13, '16, '18 ja '19 infektoituilla MDCK-soluilla 24 tunnin aikapisteessä ja vain hieman matalampaa kannoilla '99, '09F ja '14 infektoituilla soluilla (kuvat 1A ja C). Tässä aikapisteessä ainoastaan IAV-kanta '20 tuotti korkeamman M1-proteiinin ekspression kuin IAV-kannalla '09C infektoidut solut.

Kannalla '20 infektoitujen MDCK-solujen M1-ekspressio nousi edelleen 48 tunnin aikapisteessä verrattuna 24 tunnin aikapisteeseen (kuvat 12A ja C). Kannan '09C M1-ekspressio ei noussut 48 tunnin kohdalla verrattuna 24 tunnin aikapisteeseen, ja siten kanta '20 ekspressoi M1-proteiinia kannalla '09C infektoituja soluja voimakkaammin myös 48 tunnin aikapisteessä. Kannalla '13 infektoitujen solujen M1-ekspressio nousi selkeästi 48 tunnin kohdalla verrattuna 24 aikapisteeseen nousten samalla lähelle kannan '09 ekspressiota 24 tunnin kohdalla. Sen sijaan kaikilla muilla kannoilla infektoidut solut ekspressoivat M1-proteiinia 48 tunnin aikapisteessä edelleen heikommin verrattuna kannalla '09C infektoituihin soluihin 24 tunnin aikapisteessä, kannalla '09F infektoitujen solujen ekspression päästessä kuitenkin lähelle kannalla '09C infektoituja solujen tasoa ja kannalla '16 infektoitujen solujen ekspression jääden erityisen paljon matalammaksi.

Yhteenvedon voidaan todeta, että MDCK-soluilla IAV-kannat '13, '16, '18 ja '19 ekspressoivat sekä NP:a että M1-proteiinia molemmissa aikapisteissä pääsääntöisesti vähemmän kuin kanta '09C 24 tunnin aikapisteessä. Kannat '99 ja '09F ekspressoivat molemmissa aikapisteissä NP:a yhtä paljon tai enemmän, mutta M1-proteiinia vähemmän kuin '09C 24 tunnin aikapisteessä. Kannat '14 sekä '20 ekspressoivat molemmissa aikapisteissä molempia proteiineja yhtä paljon tai vähemmän kuin '09C 24 tunnin aikapisteessä.



Kuva 13. IAV:n NP:n ja M1-proteiinin ekspressio A549-soluissa. A) Yhdeksällä eri IAV-kannalla (taulukko 1) infektoituissa A549-soluissa ekspressoituvat IAV-proteiinit NP ja M1 sekä solun ylläpitoproteiini GAPDH näkyvät proteiiniraitoina vasta-ainevärjättyillä nitroselluloosakalvoilla sekä 24 tunnin että 48 tunnin aikapisteissä. B) NP- sekä C) M1-proteiniiraitojen keskiarvot ja keskihajonta (n=3) havainnollistettuna kuvaajamuodossa. Kuvaajissa NP:n ja M1-proteiinin intensiteettiä on ensin normalisoitu GAPDH:n intensiteettiä vastaan, minkä jälkeen muiden IAV-kantojen sekä mock-näytteen normalisoidut arvot on suhteutettu IAV-kannan '09C arvoihin 24 tunnin aikapisteessä. Muiden IAV-kantojen ja kannan '09C (24 h) välisten erojen tilastollista merkittävyyttä mitattiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä (ANOVA) ja Dunnettin post hoc -testillä. Erojen tilastollista merkittävyyttä mitattiin lisäksi kaksisuuntaisilla kahden toisistaan riippumattoman otoksen Studentin t-testeillä. * P<0,05, ** P<0,01.

Kuusi yhdeksästä IAV-kannasta tuotti infektoituissa A549-soluissa havaittavan määrän NP:a (kuva 13A). Kannoilla '16, '18 ja '19 infektoituissa soluissa NP-ekspressio jäi hyvin matalaksi molemmissa aikapisteissä. MDCK-soluihin verrattuna IAV-infektoidut A549-solut näyttivät ekspressoivan vähemmän M1-proteiinia (kuvat 12A ja 13A), ja kyseinen proteiini oli havaittavissa ainoastaan kantojen '09C, '09F, '14 ja '20 kohdalla (kuva 13A).

IAV-kannalla '09C tehtyihin infektoihin verrattuna kannoilla '13, '16, '18 ja '19 tehdyt infektiot tuottivat NP:n ekspressiota A549-soluissa huomattavasti heikommin ja kannalla '14 hieman heikommin 24 tunnin aikapisteessä (kuva 12B). Samassa aikapisteessä kannoilla '99 ja '09F infektoidut solut ekspressoivat NP:a lähes yhtä paljon ja kannalla '20 infektoidut solut noin 1,5 kertaa enemmän kuin kannalla '09C infektoidut solut.

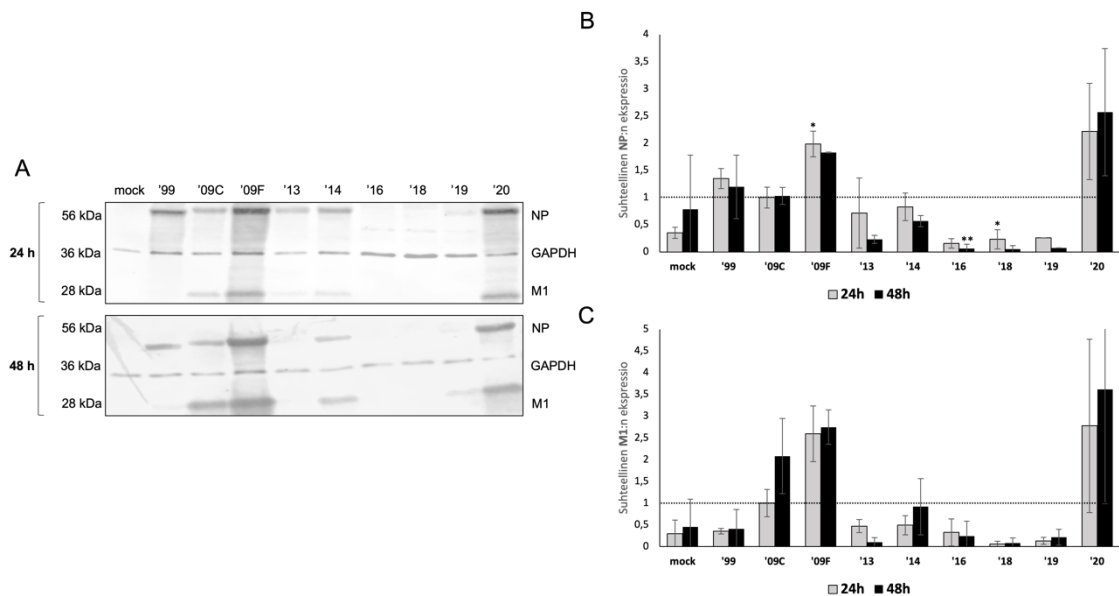
IAV-kannan '09C NP-ekspressio nousi 48 tunnin kohdalla vain hieman verrattuna 24 tunnin aikapisteeseen, mutta koska kannoilla '13, '16, '18 ja '19 infektoitujen A549-solujen NP-ekspressio ei noussut 48 tunnin aikapisteessä lainkaan tai hyvin vähän verrattuna 24 tunnin aikapisteeseen, ne jäivät 48 tunnin aikapisteessä edelleen huomattavasti alemmaksi verrattuna kannalla '09C infektoitujen solujen NP-ekspressioon 24 tunnin aikapisteessä (kuva 12B). Kannoilla '09F ja '14 infektoitujen solujen NP:n ekspressio nousi 48 tunnin kohdalla verrattuna 24 tunnin aikapisteeseen, nousten samalle tasolle tai hieman korkeammalle kuin kannalla '09C infektoitujen solujen NP-ekspressio 24 tunnin aikapisteessä. Vain IAV-kannalla '20 infektoitujen solujen NP:n ekspressio nousi 48 tunnin aikapisteessä selkeästi korkeammaksi verrattuna kannalla '09C infektoituihin soluihin 24 tunnin aikapisteessä.

A549-solut ekspressoivat M1-proteiinia 24 tunnin aikapisteessä hieman voimakkaammin vain IAV-kannalla '20 infektoituina verrattuna infektoioon kannalla '09C (kuva 12C). Muilla kannoilla infektoituina M1-ekspressio jäi samassa aikapisteessä selkeästi kannan '09C ekspressiota matalammaksi ja erityisesti kannoilla '13, '16 ja '18 ekspressio jäi lähes olemattomaksi.

A549-solujen M1-proteiinin ekspressio nousi hieman 48 tunnin aikapisteessä verrattuna ekspressioon 24 tunnin aikapisteessä kannalla '09C tai '20 infektoituina, muilla kannoilla infektoituina M1-ekspressio jäi 48 tunnin aikapisteessä suunnilleen samalle tasolle tai hieman matalammaksi kuin 24 tunnin aikapisteessä (kuva 12C).

Tiivistettynä voidaan sanoa, että A549-soluissa korkeampia tuloksia NP:n ja M1-proteiinin suhteen molemmissa aikapisteissä verrattuna kantaan '09C tuotti ainoastaan IAV-kanta '20. Kannoilla '99, '09F ja '14 infektoiduissa näytteissä NP-ekspressio muistutti

keskimääräisesti '09C-kannan ekspressiota, mutta M1-proteiinin ekspressio jäi matalammaksi. Kaikilla muilla kannoilla sekä NP:n että M1-proteiinin ekspressio jäi molemmissa aikapisteissä matalammaksi kuin kannalla '09C infektoiduissa näytteissä.



Kuva 14. IAV:n NP:n ja M1-proteiinin ekspressio Vero E6 -soluissa. A) Yhdeksällä eri IAV-kannalla (taulukko 1) infektoiduissa Vero E6 -soluissa ekspressoituvat IAV-proteiinit NP ja M1 sekä solun ylläpitoproteiini GAPDH näkyvät proteiininaitoina vasta-ainevärjätyillä nitroselluloosakalvoilla sekä 24 tunnin että 48 tunnin aikapisteissä. B) NP- sekä C) M1-proteiininaitojen keskiarvot ja keskihajonta (n=3) havainnollistettuna kuvaajamuodossa. Kuvaajissa NP:n ja M1-proteiinin intensiteettiä on ensin normalisoitu GAPDH:n intensiteettiä, minkä jälkeen muiden IAV-kantojen sekä mock-näytteen normalisoidut arvot on suhteutettu IAV-kannan '09C arvoihin 24 tunnin aikapisteessä. Muiden IAV-kantojen ja kannan '09C (24 h) välisten erojen tilastollista merkittävyyttä mitattiin yksisuuntaisella varianssanalyysillä (ANOVA) ja Dunnettin post hoc -testillä. Erojen tilastollista merkittävyyttä mitattiin lisäksi kaksisuuntaisilla kahden toisistaan riippumattoman otoksen Studentin t-testeillä. * P<0,05, ** P<0,01.

Kuten A549-solujen kohdalla, kannoilla '16, '18 ja '19 infektoidut Vero E6 -solut eivät tuottaneet havaittavia määriä NP-proteiinia kummassakaan valituista aikapisteissä (Kuva 14A). Lisäksi kannalla '13 infektoiduissa Vero E6 -soluissa NP-ekspressio jäi hyvin heikoksi myös 48 tunnin aikapisteessä. M1-ekspressio Vero E6 -soluissa muistuttaa myös omalta osaltaan tilannetta A549-soluissa, joissa immunoblottauksessa havaittavaa proteiiniekspressiota oli vain kantojen '09C, '09F, '14 ja '20 kohdalla (kuvat 13A ja 14A).

NP:n ekspressio nousi 24 tunnin aikapisteessä korkeammalle infektoitaessa Vero E6 -solut IAV-kannoilla '99, '09F tai '20, verrattuna infektoioon IAV-kannalla '09C (kuva 13B). Kannalla '13 tai '14 infektoitujen solujen NP-ekspressio jäi keskimäärin hieman

alemmaksi kuin kannalla '09C infektoidut solujen ekspresio samassa aikapisteessä, ja kantojen '16, '18 ja '19 NP-ekspresio oli selkeästi kannan '09C ekspresiota matalampi.

Vain IAV-kannalla '20 infektoiduna Vero E6 -solujen NP:n ekspresio kasvoi selkeästi 48 tunnin kuluttua infektiosta verrattuna 24 tunnin aikapisteeseen (kuva 13B). Siten kannan '20 NP-ekspresio oli 48 tunnin kohdalla edelleen kannan '09C 24 tunnin kohdalla ekspresiota voimakkaampi. Kannalla '09C infektoiduissa solujen NP-ekspresio oli lähes samalla tasolla sekä 24 että 48 tunnin aikapisteessä ja muilla kannoilla infektoiduissa solujen NP-ekspresio oli 48 tunnin aikapisteessä matalampi kuin 24 tunnin aikapisteessä. Tästä huolimatta kannalla '99 tai '09F infektoidut solut ekspresioivat NP:a 48 tunnin kohdalla edelleen enemmän, kuin kannalla '09C infektoiduna 24 tunnin aikapisteessä. Sen sijaan etenkin kantojen '16, '18 ja '19 NP-ekspresio oli soluissa lähes olematonta 48 tunnin kohdalla verrattuna kannan '09C NP:n ekspresioon 24 tunnin aikapisteessä. Kantojen '13 sekä '14 NP-ekspresio jäi vielä matalammaksi 48 tunnin kohdalla kuin 24 tunnin kohdalla verrattuna NP:n ekspresioon kannalla '09C infektoiduissa Vero E6 -soluissa.

IAV-kannalla '09F tai '20 infektoiduissa Vero E6 -solut ekspresioivat M1-proteiinia 24 tunnin kuluttua infektiosta voimakkaammin verrattuna kannalla '09C tehtyyn infektiin samassa aikapisteessä (kuva 13C). Kannoilla '99, '13, '14 tai '16 infektoiduissa M1-ekspresio jäi soluissa 24 tunnin aikapisteessä selvästi matalammaksi, kuin infektoiduissa solut kannalla '09C. Infektoiduissa solut kannoilla '18 tai '19 ekspresio jäi 24 tunnin aikapisteessä erityisen paljon matalammaksi verrattuna kannan '09C ekspresioon.

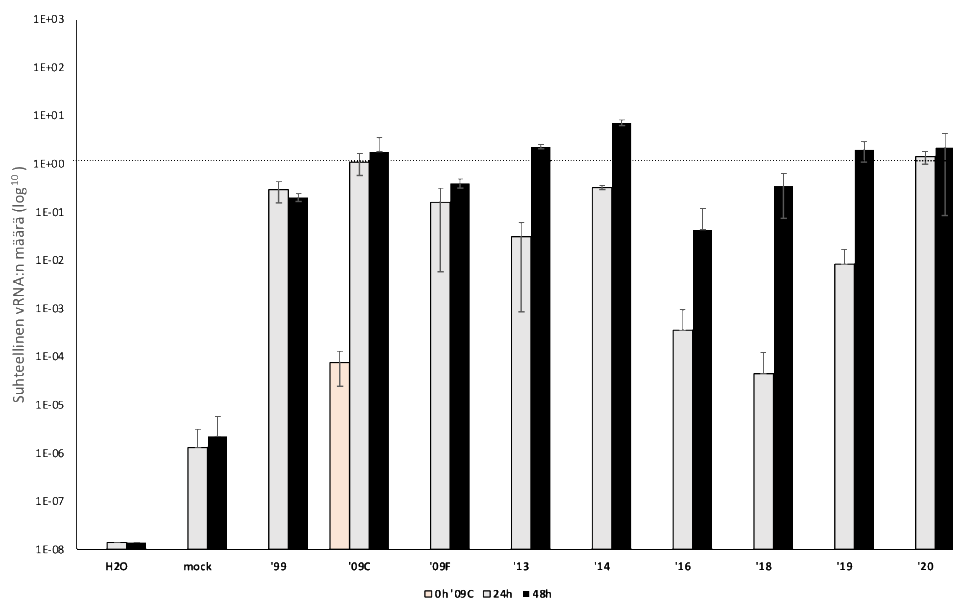
M1-proteiinin ekspresio oli selkeästi voimakkaampaa 48 tunnin aikapisteessä kuin 24 tunnin aikapisteessä, kun Vero E6 -solut oli infektoidu IAV-kannalla '09C (kuva 13C). Myös kannoilla '09F, '14 tai '20 infektoiduissa solujen M1-ekspresio kasvoi selkeästi 48 tunnin aikapisteessä verrattuna 24 tunnin aikapisteeseen. Kuitenkin vain kannoilla '09F tai '20 infektoiduissa solut ekspresioivat M1-proteiinia vahvemmin 48 tunnin kohdalla verrattuna kannan '09C ekspresioon 24 tunnin aikapisteessä. Solut kannalla '14 infektoiduissa M1-ekspresio jäi keskimääräisesti hieman matalammaksi 48 tunnin aikapisteessä, kuin kannalla '09C infektoiduissa 24 tunnin aikapisteessä. Kantojen '99, '18 ja '19 M1-proteiinin ekspresio oli joko lähelle samaa tasoa sekä 24 että 48 tunnin aikapisteessä tai nousi vain hieman 48 tunnin kohdalla verrattuna 24 tunnin aikapisteeseen. Sen sijaan kannoilla '13 tai '16 infektoidut solut ekspresioivat M1-proteiinia jopa heikommin

48 tunnin kuin 24 tunnin jälkeen infektiosta. Siten kantojen '99, '13, '16, '18 ja '19 M1-proteiinin ekspresio jäi 48 tunnin aikapisteessä selkeästi heikommaksi, kuin solujen M1-ekspresio 24 tunnin aikapisteessä infektoitaessa ne kannalla '09C.

Tiivistettynä voidaan todeta, että Vero E6 -soluissa IAV-kannat '13, '16, '18 ja '19 tuottivat heikommin sekä NP:a että M1-proteiinia molemmissa aikapisteissä verrattuna kantaan '09C aikapisteessä 24 tuntia. Kannalla '99 infektoituna vain NP-ekspresio nousi sekä 24 että 48 tunnin aikapisteessä korkeammaksi kuin kannalla '09C infektoituina 24 tunnin aikapisteessä, kun taas kannoilla '09F ja '20 molempien proteiinien ekspresio nousi soluissa molemmissa aikapisteissä korkeammaksi. Kannan '14 proteiiniekspressio jäi muuten molemmissa aikapisteissä matalammaksi, paitsi 48 tunnin aikapisteessä M1-proteiinin ekspresio nousi tällä kannalla Vero E6 -soluissa samalle tasolle kuin kannalla '09C 24 tunnin aikapisteessä.

3.2 Influenssa A -virus-RNA:n tuotto

IAV:illa infektoitujen solujen kasvatusmediumiin tuotetun vRNA:n määrä kvantitoitiin käänteistranskriptaasi-PCR:llä eli RT-qPCR:llä. Infektiokokeista kerätyistä supernatanteista eristettiin RNA, joka monistettiin yksivaiheisella RT-qPCR:llä. IAV-kannat jaettiin molemmissa aikapisteissä (24 tai 48 tuntia infektiosta) suhteutettujen ΔC_t -arvojen perusteella kolmeen ryhmään: niihin, joilla solut tuottavat vRNA:ta yhtä paljon, enemmän tai vähemmän kuin IAV-kannalla '09C infektoidut solut 24 tunnin aikapisteessä.



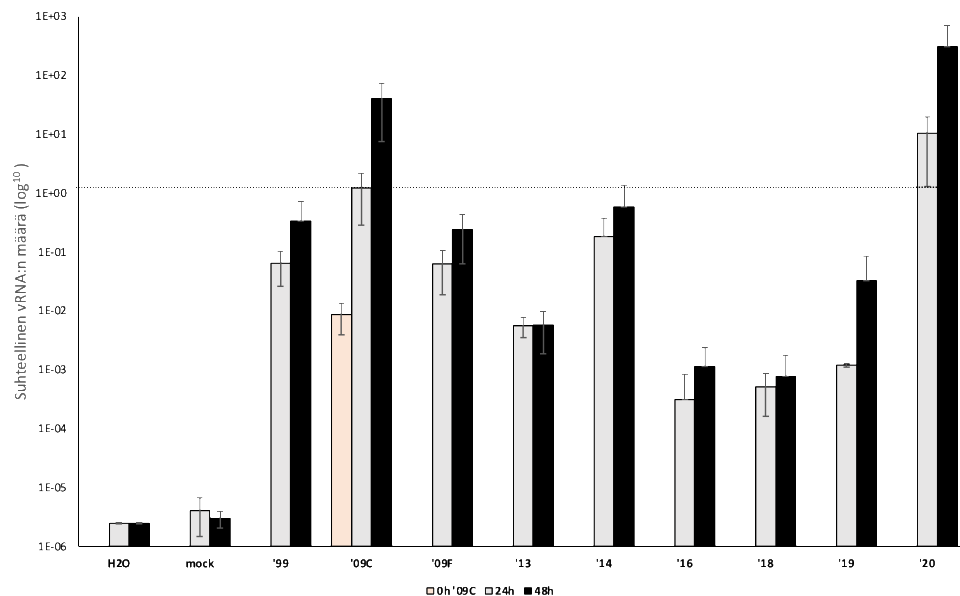
Kuva 15. MDCK-kasvatusmediumiin tuotetun vRNA:n määrä. RT-qPCR-menetelmällä saatiin RNA-näytteiden Ct-arvot, joista laskettujen Δ Ct-arvojen avulla näytteiden vRNA:n määrää voitiin havainnoida pylväskuvaajassa. RNA:n keskiarvoiset määrät ja hajonnat ($n=3$) on kuvaajassa ilmoitettu logaritmisella asteikolla (\log^{10}). Muilla IAV-kannoilla (taulukko 1) infektoitujen MDCK-solujen tuottamat RNA:n määrien keskiarvot on molemmissa aikapisteissä (24 ja 48 tuntia infektiosta) suhteutettu kannalla '09C infektoitujen MDCK-solujen tuottamaan vRNA:n määrien keskiarvoon 24 tunnin aikapisteessä. Kuvaajassa on esitetty myös kannalla '09C tehdyistä infektiokokeista 0 tunnin aikapisteessä kerättyjen näytteiden vRNA:n keskiarvoinen määrä (vaaleanpunainen pylväs). Muiden IAV-kantojen ja kannan '09C (24 h) välisten erojen tilastollista merkittävyyttä mitattiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä (ANOVA) sekä Dunnettin post hoc -testillä.

IAV-kannalla '09C infektoitujen MDCK-solujen ulkopuolista vRNA:ta oli havaittavissa jo heti solujen infektoimisen jälkeen eli 0 tunnin aikapisteessä, mutta määrä oli noin 10 000 kertaa pienempi verrattuna samalla kannalla tehdyn infektiokokeen 24 tunnin aikapisteessä (kuva 15). Kannalla '20 infektoituina solut tuottivat 24 tunnin aikapisteessä suunnilleen saman määrän vRNA:ta kuin kannalla '09C infektoituina eikä niiden välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa. Muilla kannoilla infektoituina solujen tuottama vRNA:n määrä jäi merkitsevästi alhaisemmaksi kuin kannalla '09C infektoituina, erojen ollessa suurimmaksi osin noin 10–1000 kertaisia. Erityisen alhaiseksi määrä jäi kuitenkin infektoitaessa solut kannalla '16 tai '18; erot olivat 24 tunnin kohdalla 1000–10 000 kertaisia verrattuna solujen tuottamaan vRNA:n määrään infektoituina kannalla '09C.

MDCK-solut eivät tuottaneet vRNA:ta 48 tunnin kohdalla huomattavasti enempää IAV-kannalla '09C infektoituina kuin 24 tunnin jälkeen infektiosta. Kannalla '13 tai '20 infektoituina solut tuottivat 48 tunnin aikapisteessä hieman enemmän vRNA:ta kuin 24 tunnin aikapisteessä kannalla '09C infektoituina, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä. Sen

sijaan kannalla '14 infektoituina solut tuottivat 48 tunnin aikapisteessä vRNA:ta merkittävästi enemmän verrattuna kannan '09C aikaansaamaan vRNA:n tuottoon 24 tunnin aikapisteessä, ja ero oli noin kymmenkertainen. Muilla kannoilla infektoituina solujen vRNA:n tuotto jäi 48 tunnin aikapisteessä enää noin 10–100 kertaa matalammaksi verrattuna kannalla '09C infektoitujen solujen vRNA:n tuottoon 24 tunnin aikapisteessä, eivätkä erot olleet tilastollisesti merkitseviä.

Yhteenvedon voidaan sanoa, että MDCK-soluissa 24 tunnin aikapisteessä kanta '20 tuotti suunnilleen saman määrän vRNA:ta kuin kanta '09C, kun taas muiden kantojen tuottama vRNA:n määrä jäi merkittävästi alhaisemmaksi. Kantojen '13, '14, '19 ja '20 vRNA:n tuotto nousi korkeammaksi vasta 48 tunnin aikapisteessä verrattuna kannan '09C vRNA:n tuottoon 24 tunnin aikapisteessä.



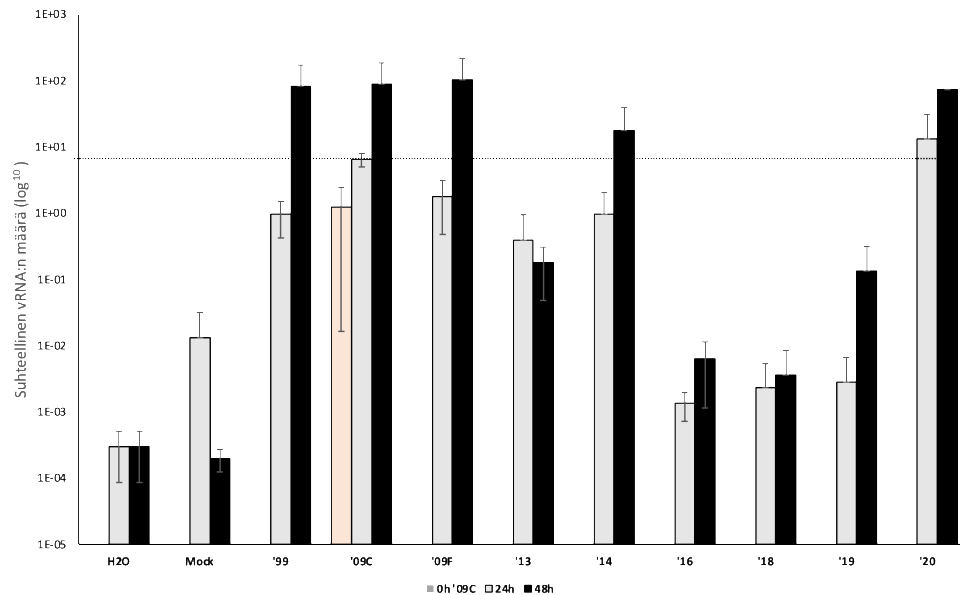
Kuva 16. A549-kasvatusmediumiin tuotetun vRNA:n määrä. RT-qPCR-menetelmällä saatiin RNA-näytteiden Ct-arvot, joista laskettujen Δ Ct-arvojen avulla näytteiden vRNA:n määrää voitiin havainnoida pylväskuvaajassa. RNA:n keskiarvoiset määrät ja hajonnat ($n=3$) on kuvaajassa ilmoitettu logaritmisella asteikolla (\log^{10}). Muilla IAV-kannoilla (taulukko 1) infektoitujen A549-solujen tuottamat vRNA:n määrien keskiarvot on molemmissa aikapisteissä (24 ja 48 tuntia infektiosta) suhteutettu kannalla '09C infektoitujen A549-solujen tuottamaan vRNA:n määrien keskiarvoon 24 tunnin aikapisteessä. Kuvaajassa on esitetty myös kannalla '09C tehdyistä infektiokokeista 0 tunnin aikapisteessä kerättyjen näytteiden vRNA:n keskiarvoinen määrä (vaaleanpunainen pylväs). Muiden IAV-kantojen ja kannan '09C (24 h) välisten erojen tilastollista merkittävyyttä mitattiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä (ANOVA) sekä Dunnettin post hoc -testillä.

A549-solujen tuottaman vRNA:n määrä oli 0 tunnin aikapisteessä infektiosta noin 100 kertaa matalampi kuin 24 tunnin aikapisteessä infektoitaessa solut IAV-kannalla '09C

(kuva 16). Infektoituna kannalla '20 solujen tuottaman vRNA:n määrä oli 24 tunnin aikapisteessä noin kymmenen kertaa korkeampi verrattuna infektiioon tehtynä kannalla '09C, ja ero oli tilastollisesti merkitsevä. Samassa aikapisteessä kannalla '99, '09F tai '14 solujen tuottaman vRNA:n määrä oli 10–100 kertaa alhaisempi kuin kannalla '09C infektoituina. Kannalla '13, '16, '18 tai '19 infektoituina A549-solut tuottivat 24 tunnin kuluttua infektiosta noin 100–1000 kertaa vähemmän vRNA:ta. Matalammilla solujen tuottamalla vRNA:n määrillä ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkittävää eroa kannalla '09C infektoitujen solujen tuottamaan vRNA:n määrään 24 tunnin aikapisteessä.

A549-solujen ulkopuolisen vRNA:n määrä nousi huomattavasti, mutta ei tilastollisesti merkitsevästi 48 tunnin kohdalla verrattuna 24 tunnin aikapisteeseen, kun solut oli infektoitu kannalla '09C. Solujen tuottaman vRNA:n määrä nousi 48 tunnin aikapisteessä myös kannalla '20 infektoituina korkeammalle kuin 24 tunnin aikapisteessä infektoitaessa solut kannalla '09C, mutta tälläkään erolla ei ollut tilastollista merkitsevyyttä. Muillakin kannoilla infektoituina solujen tuottaman vRNA:n määrä nousi 48 tunnin aikapisteessä verrattuna 24 tunnin aikapisteeseen, mutta yhdenkään kannan tuottama määrä ei noussut korkeammalle kuin kannan '09C tuottama määrä 24 tunnin kuluttua infektiosta. Infektoitaessa solut kannalla '99, '09F tai '14 vRNA:n määrä jäi vain alle kymmenen kertaa matalammaksi, mutta infektoitaessa solut kannalla '13, '16, '18 tai '19 vRNA:n määrä jäi noin 10–1000 kertaa pienemmäksi kuin solujen tuottaman vRNA:n määrä 24 tunnin aikapisteessä kannalla '09C infektoituina. Eroilla ei ollut tilastollista merkitsevyyttä.

Tiivistettynä voidaan sanoa, että A549-soluissa ainoastastaan kannan '20 vRNA:n tuotto oli molemmissa aikapisteissä korkeampaa kuin kannan '09C vRNA:n tuotto 24 tunnin aikapisteessä. Muiden kantojen vRNA:n tuotto jäi samaan vertailukohteeseen verrattuna matalammaksi sekä 24 että 48 tunnin aikapisteissä.



Kuva 17. Vero E6-kasvatusmediumiin tuotetun vRNA:n määrä. RT-qPCR-menetelmällä saatiin RNA-näytteiden Ct-arvot, joista laskettujen Δ Ct-arvojen avulla näytteiden vRNA:n määrää voitiin havainnoida pylväskuvaajassa. RNA:n keskiarvoiset määrät ja hajonnat ($n=3$) on kuvaajassa ilmoitettu logaritmisella asteikolla (\log^{10}). Muilla IAV-kannoilla (taulukko 1) infektoitujen Vero E6-solujen tuottamat vRNA:n määrien keskiarvot on molemmissa aikapisteissä (24 ja 48 tuntia infektiosta) suhteutettu kannalla '09C infektoitujen Vero E6-solujen tuottamaan vRNA:n määrien keskiarvoon 24 tunnin aikapisteessä. Kuvaajassa on esitetty myös kannalla '09C tehdyistä infektiokokeista 0 tunnin aikapisteessä kerättyjen näytteiden vRNA:n keskiarvoinen määrä (vaaleanpunainen pylvä). Muiden IAV-kantojen ja kannan '09C (24 h) välisten erojen tilastollista merkittävyyttä mitattiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä (ANOVA) sekä Dunnettin post hoc -testillä.

Kun IAV-kannalla '09C infektoitiin Vero E6 -soluja, jäi solujen tuottaman vRNA:n määrän ero 0 tunnin aikapisteen ja 24 tunnin aikapisteen välillä todella pieneksi (kuva 17). Infektoitaessa solut kannalla '99, '09F, '13 tai '14 oli solujen tuottaman vRNA:n määrä 24 tunnin jälkeen infektiosta alle kymmenen kertaa pienempi kuin infektoitaessa ne kannalla '09C. Kun solut infektoitiin kannalla '16, '18 tai '19, oli solujen tuottaman vRNA:n määrä 48 tunnin aikapisteessä noin 1000–10 000 kertaa matalampi kuin 24 tunnin aikapisteessä infektoituina kannalla '09C. Kannan '20 soluissa tuottama vRNA:n tuotto oli 24 tunnin kohdalla noin seitsemän kertaa korkeampi kuin kannan '09C tuottama vRNA:n määrä. Millään edellä mainituista eroista ei ollut tilastollista merkittävyyttä.

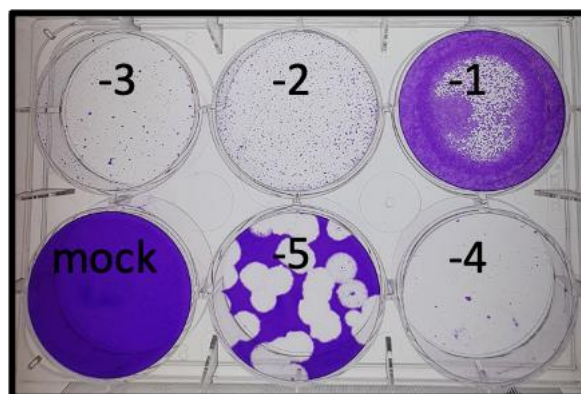
Vero E6 -soluissa tuottuneen vRNA:n määrä nousi sekä kannalla '99, '09C, '09F että '20 infektoituina 48 tunnin aikapisteessä noin sata kertaa korkeammaksi kuin 24 tunnin aikapisteessä kannalla '09C infektoituina. Solujen tuottaman vRNA:n määrä nousi 48 tunnin kohdalla myös kannalla '14 infektoituina verrattuna solujen tuottamaan vRNA:n määrään 24 tunnin aikapisteessä kannalla '09C infektoituina, mutta ero oli alle kymmenkertainen.

Alle kymmenenkertaiseksi jäi ero myös infektoitaessa Vero E6 -solut kannalla '19 tai '13, joiden vRNA:n tuotto 48 tunnin aikapisteessä oli kuitenkin matalampi verrattuna vRNA:n tuottoon 24 tunnin aikapisteessä kannalla '09C infektoiduissa soluissa. Infektoitaessa solut kannalla '16 tai '18 oli tuottuneen vRNA:n määrä 48 tunnin aikapisteessä 100–1000 kertaa matalampi verrattuna kannalla '09C infektoitujen solujen 24 tunnin aikapisteessä tuottamaan vRNA:n määrään. Edellä mainituista eroista ei löytynyt tilastollista merkittävyyttä.

Tiivistetysti voidaan sanoa, että Vero E6 -soluissa vain IAV-kanta '20 tuotti korkeampia vRNA-määriä jo 24 tunnin aikapisteessä. Kannat '99, '09F, '14 ja '20 tuottivat vasta 48 tunnin aikapisteessä enemmän vRNA:ta kuin kanta '09C 24 tunnin aikapisteessä. Muut kannat tuottivat molemmissa aikapisteissä vähemmän vRNA:ta kuin kanta '20C 24 tunnin aikapisteessä.

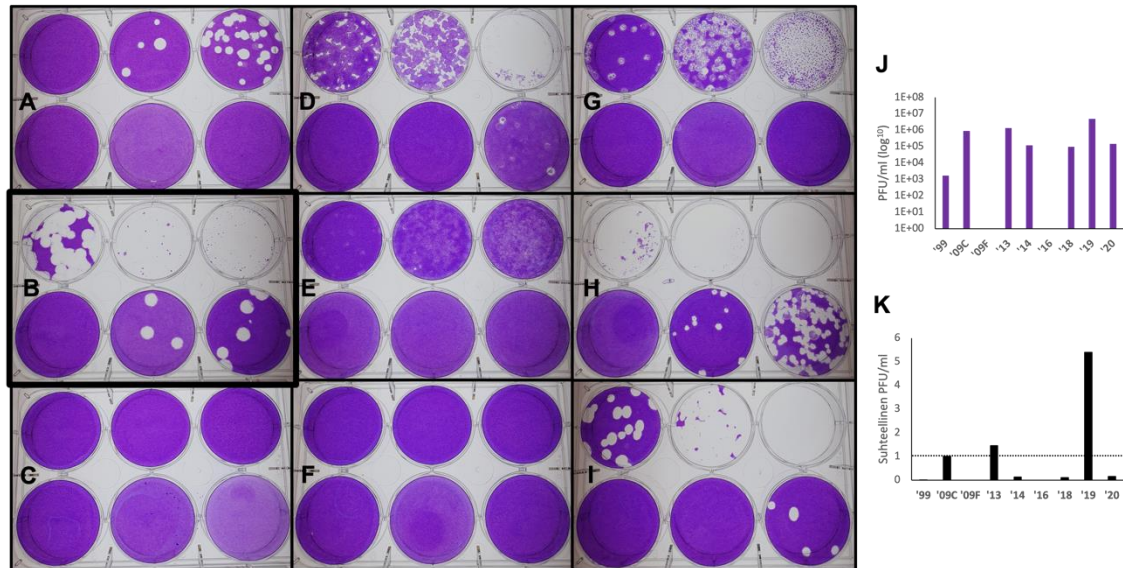
3.3 Infektiivisten influenssa A -virionien tuotto

IAV:illa infektoitujen solujen kasvatusmediumiin tuottuneiden infektiokykyisten virionien määrää mitattiin plakkititrauksella. Negatiivisena kontrollinäytteenä käytettiin virusta sisältämätöntä kasvatusmediumia ja positiivisena kontrollina A/California/07/09(H1N1pdm09) -viruksen stokkikasvatusta, jonka tiedettiin aiempien kokeiden perusteella tuottavan tässä käytetyillä laimennoksilla helposti havaittavia tuloksia (kuva 18).



Kuva 18. Esimerkkikuva plakkititrausten positiivisesta kontrollista. MDCK-solut infektoitiin sarjalaimennetulla (10^{-1} – 10^{-5}) IAV-virusstokilla A/California/07/09(H1N1pdm09), jonka tiedettiin aiempien kokeiden perusteella muodostavan näillä laimennoksilla selkeästi havaittavia plakkeja. Vasemmalla alakulmassa kyseisen plakkititrauksen sisäinen negatiivinen kontrolli.

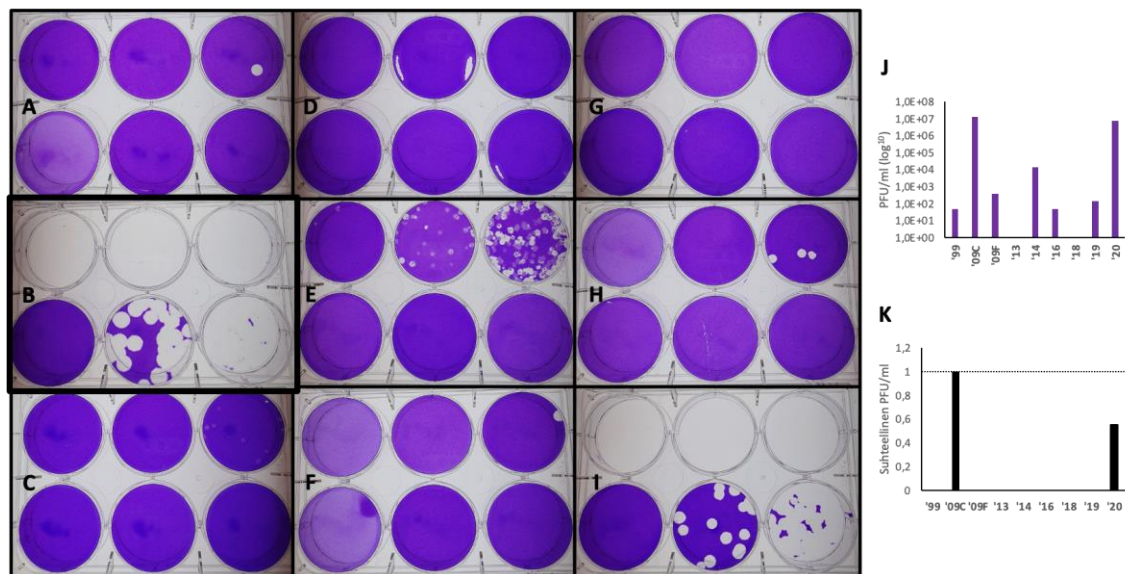
Kannalla '09C tehdyn infektiokokeen kasvatusmediumista kerätyn näytteen plakkititrauksesta saatuun lukuun suhteutettuja tuloksia tarkastelemalla IAV-kannat voitiin jakaa kolmeen kategoriaan: niihin, joilla infektoituina solut tuottivat infektiivisiä virioneja yhtä paljon, enemmän tai vähemmän kuin IAV-kannalla '09C infektoituina 48 tunnin kuluttua infektiosta.



Kuva 19. Plakkititraukset MDCK-soluilla tehdyistä infektiokokeista. Infektiokokeista 48 tunnin aikapisteessä kerättyjen kasvatusmediumien sisältämien virusten muodostamat plakit, kun MDCK-solut oli infektoitu sarjalaimennetulla (10^{-1} – 10^{-5}) IAV-kannalla A) '99, B) '09C, C) '09F, D) '13, E) '14, F) '16, G) '18, H) '19 tai I) '20 (taulukko 1). J) plakkien perusteella lasketut IAV-kantakohtaiset tiitterit kuvaajamuodossa logaritmisina arvoina ilmoitettuina (\log^{10}) ja K) suhteutettuna IAV-kantaan '09C.

IAV-kannalla '09C infektoidut MDCK-solut tuottivat 48 tunnin kuluttua infektiosta uusia infektiokykyisiä virioneja tiitterillä $9,25 \times 10^5$ PFU/ml (kuva 18 J). Kannoilla '13 tai '19 infektoidut solut tuottivat samassa aikapisteessä kymmenkantisella logaritmisella aseikolla (\log^{10}) yhden arvon verran enemmän infektiokykyisiä virioneja kuin kannalla '09C infektoidut solut, eron ollessa siten '13 ja '09C välillä melkein puolitoistakertainen ja '19 ja '09C välillä yli viisinkertainen (kuva 18 K). Muilla kannoilla infektoidut solut tuottivat vähemmän virioneja kuin kannalla '09C infektoidut solut. Kannalla '14, '18 tai '20 infektoitujen solujen tuottama virionien määrä pysyi samalla logaritmisella arvolla, mutta oli kuitenkin 6–9 kertaa matalampi. Kannoilla '99 infektoitujen solujen tuottama infektiokykyisten virionien määrä jäi juuri ja juuri havaittavan alhaiseksi ja kannoilla '09F tai '16 infektoitaessa MDCK-solut eivät tuottaneet plakkititrauksessa havaittavia infektiokykyisiä virioneja 48 tunnin aikapisteessä lainkaan (kuva 18 C, F, J).

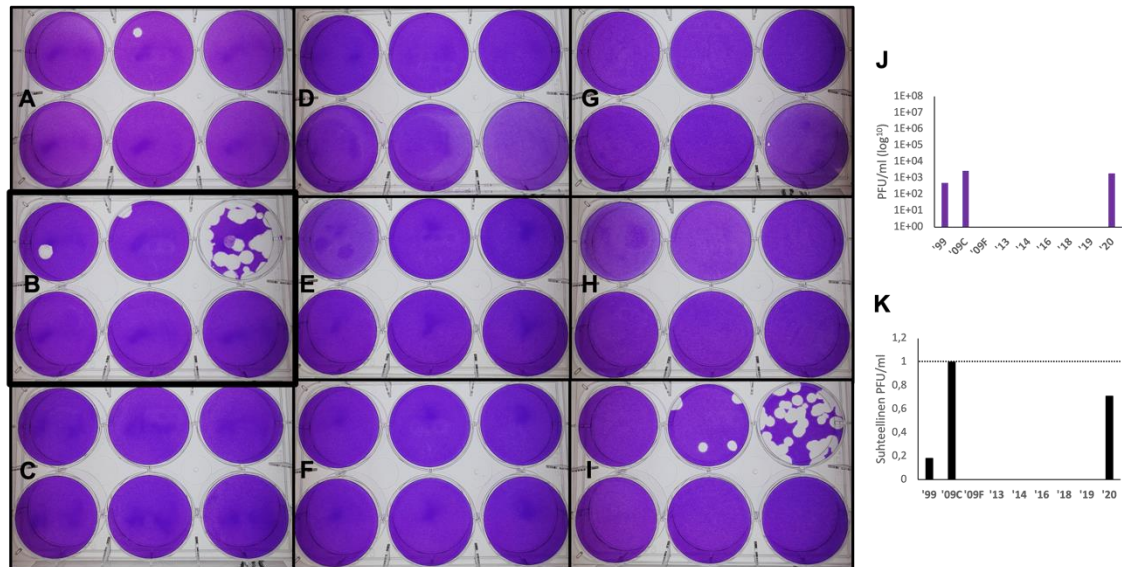
Yhteenvedon voidaan todeta, että MDCK-soluissa infektiokykyisiä virioneja tuottui kaikilla muilla IAV-kannoilla paitsi kannoilla '09F ja '16. Kannat '13 ja '19 tuottivat MDCK-soluissa enemmän infektiokykyisiä virioneja kuin kannalla '09C. Muiden IAV-kantojen infektiokykyisten virionien tuotto jäi matalammaksi.



Kuva 20. Plakkititratukset A549-soluilla tehdystä infektiokokeista. Infektiokokeista 48 tunnin aikapisteessä kerättyjen kasvatusmediumien sisältämien virusten muodostamat plakit, kun A549-solut oli infektoitu sarjalaimennetulla (10^{-1} – 10^{-5}) IAV-kannalla A) '99, B) '09C, C) '09F, D) '13, E) '14, F) '16, G) '18, H) '19 tai I) '20 (ks. taulukko 1). J) plakkien perusteella lasketut IAV-kantakohtaiset tiitterit kuvaajamuodossa logaritmisina arvoina ilmoitettuna (\log^{10}) ja K) suhteutettuna IAV-kantaan '09C.

IAV-kannalla '09C infektoitaessa A549-solut tuottivat 48 tunnin jälkeen uusia infektiokykyisiä virioneja tiitterillä $13,5 \times 10^6$ (kuva 19 J). Kaikilla muilla kannoilla infektoituna solujen tuottamien uusien virionien tiitteri jäi huomattavasti matalammaksi tai kokonaan havaitsemattomaksi. Kannalla '20 infektoituina A549-solut tuottivat lähes kaksi kertaa vähemmän infektiokykyisiä virioneja ja kannalla '14 infektoituina ero '09C kannalla infektoituihin soluihin oli tuhatkertainen (kuva 19 K). Infektiokykyisten virionien tiitterit jäivät lähes havaitsemattomaksi, kun solut infektoitiin kannalla '99, '09F, '16 tai '19 ja niiden ero kannalla '09C infektoitujen solujen virionien tuottoon oli kymmenkantaisella logaritmisella asteikolla (\log^{10}) neljän tai viiden arvon suuruinen. Kannoilla '13 tai '18 infektoituina A549-solut eivät MDCK-soluilla tehdyn plakkititratuksen perusteella tuottaneet ollenkaan infektiokykyisiä virioneja 48 tunnin kuluessa infektiosta (kuva 19 D, G, J).

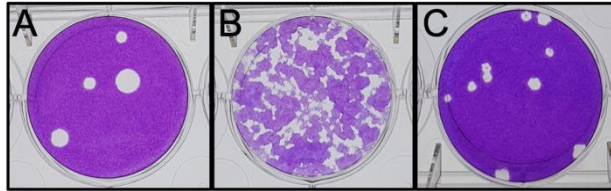
Yhteenvedon voidaan sanoa, että A549-soluissa infektiivisiä virioneja tuottui kaikilla muilla IAV-kannoilla, paitsi kannoilla '13 ja '18. Virionien tuotto jäi kaikilla kannoilla matalammaksi kuin kannalla '09C.



Kuva 21. Plakkititraukset Vero E6 -soluilla tehdystä infektiokokeista. Infektiokokeista 48 tunnin aikapisteessä kerättyjen kasvatusmediumien sisältämien virusten muodostamat plakit, kun Vero E6 -solut oli infektoitu sarjalaimennetulla (10^{-1} – 10^{-5}) IAV-kannalla A) '99, B) '09C, C) '09F, D) '13, E) '14, F) '16, G) '18, H) '19 tai I) '20 (ks. taulukko 1). J) plakkien perusteella lasketut IAV-kantakohtaiset tiitterit kuvaajamuodossa logaritmisina arvoina ilmoitettuna (\log^{10}) ja K) suhteutettuna IAV-kantaan '09C.

Vero E6 -solut tuottivat infektiokykyisiä virioneja plakkititrauksessa havaittavan määrän 48 tunnin jälkeen infektiosta vain kolmella IAV-kannalla infektoituina ja silloinkin tiitterit jäivät hyvin mataliksi (kuva 20 J). Kannalla '09C infektoituina solut tuottivat virioneja tiitterillä $2,8 \times 10^3$ PFU/ml. Verrattuna '09C soluissa tuottamaan tiitteriin, kahdella muulla virioneja Vero E6 -soluissa tuottaneella kannalla tiitteri jäi lähes puolitoista kertaa ('20) tai yli viisi kertaa ('99) matalammaksi (kuva 20 K). Muilla kannoilla infektoituina Vero E6 -solut eivät tuottaneet MDCK-soluilla tehdyn plakkititrauksen perusteella 48 tunnin aikapisteessä infektiokykyisiä virioneja lainkaan (kuva 20 A, C, D, E, F, G, H, J).

Tiivistetysti voidaan todeta, että infektiivisiä virioneja tuottui Vero E6 -solut IAV-kannoilla '99, '09C tai '20 infektoituna. Virionien tuotto jäi matalammaksi kaikilla kannoilla verrattuna kantaan '09C.



Kuva 22. Eri IAV-kantojen tuottamia ja fenotyypiltään erilaisia plakkeja. Plakkien fenotyypit toistuivat samankaltaisina kaikilla kolmella solulinjalla (MDCK, A549, Vero E6) tehtyjen infektiokokeiden näytteiden plakkititrauksessa. A) IAV-kannoilla '99, '09C tai '20 tehdyistä infektiokokeista 48 tunnin aikapisteen kohdalla kerätyt näytteet tuottivat plakkititrauksissa keskenään samankaltaisia, suuria ja selkeärajaisia plakkeja. B) kannoilla '09F, '13, '14, '16 tai '18 tehdyistä infektiokokeista 48 tunnin aikapisteessä kerättyjen näytteiden plakkititraukset tuottivat epäselkeärajaisia ja utuisia plakkeja. C) kannalla '19 tehdystä infektiokokeesta 48 tunnin aikapisteessä kerätyn näytteen plakkititraus tuotti selkeärajaisia, mutta pieniä plakkeja.

Tuloksia tarkasteltaessa havaittiin myös eroja eri IAV-kannoilla tehdyistä infektiokokeista saatujen plakkien fenotyypeissä (kuva 22). Plakkien fenotyyppien erot toistuivat samanlaisina riippumatta siitä, millä kolmesta solulinjasta (MDCK, A549 tai Vero E6) infektiokoe oli tehty. Selkeimmin fenotyyppien erot olivat kuitenkin havaittavissa plakkititrauksissa, joissa oli käytetty MDCK-solulinjalla tehdyistä infektiokokeista saatuja näytteitä. IAV-kannoilla '99, '09C tai '20 tehdyistä infektiokokeista 48 tunnin aikapisteessä kerätyt näytteet tuottivat plakkititrauksissa keskenään samantyyppisiä, suuria ja selkeärajaisia plakkeja. Sen sijaan kannoilla '13, '14 tai '16 tehdyistä infektiokokeista 48 tunnin aikapisteessä kerättyistä näytteistä tuottuneet plakit olivat utuisia ja epäselkeästi rajautuneita. Kannalla '19 tehdyistä infektiokokeista 48 tunnin kohdalla kerätyt näytteet tuottivat plakkititrauksessa selkeärajaisia, mutta pieniä plakkeja.

3.4 Tulosten yhteenveto

Kaikilla yhdeksällä tässä työssä käytetyllä IAV-kannalla tehtyjen infektiokokeiden tuloksista oli havaittavissa eroja verrattuna kannalla '09C tehtyjen infektiokokeiden tuloksiin suurimmalla osalla käytetyistä menetelmistä, mikä voidaan nähdä koosteena tutkielman liitteenä olevassa taulukossa 3. IAV-kantojen väliset erot toistuivat pääsääntöisesti samankaltaisina kaikilla kolmella solulinjalla, mutta solulinjojen IAV-proteiinien, vRNA:n ja virionien tuoton välillä oli melko suuria eroja. Verrattuna IAV-kannalla '09C 24 tunnin aikapisteessä saatuihin tuloksiin, eniten samankaltaisia tuloksia saatiin infektiokokeista, jotka oli tehty kannoilla '99, '09F tai '14. Muilla kannoilla tulokset olivat suurimmaksi osaksi matalampia verrattuna kannalla '09C saatuihin tuloksiin, paitsi kannalla '20, jolla saadut tulokset olivat korkeampia lähes kaikilla menetelmillä.

Taulukko 2. Työssä käytetyt yhdeksän IAV-kantaa ja niiden lyhenne, influenssakausi, jolloin kannat kiersivät sekä työssä käytettyjen kolmen menetelmän tulokset. Influenssakaudella 2009–2010 ja sen jälkeen kiertäneistä IAV-kannoista käytetään nimitystä H1N1pdm09. Taulukossa lyhenteellä '09C tarkoitetaan influenssakaudella 2009–2010 Kaliforniassa eristettyä viruskantaa ja lyhenteellä '09F tarkoitetaan samalla influenssakaudella Suomessa eristettyä viruskantaa. Muiden kantojen kohdalla niistä käytetään viruksen eristysvuoden lyhennettä. Infektiokokeista kerättiin näytteet 24 ja 48 tunnin aikapisteissä. Solulysaatit ja kasvatusmedium analysoitiin yhteensä kolmella eri menetelmällä, joita olivat immunoblottaus, RT-qPCR ja plakkititraus. Influenssakausilla 1998–1999 tai 2009–2020 kiertäneillä IAV-kannoilla tehdyistä infektiosta saadut luvut suhteutettiin lukuihin, jotka saatiin influenssakaudella 2009–2010 Kaliforniassa kiertäneellä IAV-kannalla tehdyistä infektiosta 24 tunnin aikapisteessä. Siten muiden IAV-kantojen soluissa tuottamaa virusproteiinin ekspressiota sekä vRNA:n ja infektiokykyisten virionien tuottoa voitiin verrata vuoden 2009 pandeemisen A/H1N1pdm09-kannan ('09C, alleviivattu) tuottamiin määriin. Kannalla '09C saatuihin tuloksiin verrattuna matalimmat tulokset on esitetty taulukossa punaisella, samantasoiset tulokset keltaisella ja korkeammat tulokset vihreällä.

IAV-kanta	Lyhenne	Influenssakausi	Western Blot		Western Blot		RT-qPCR		Plakkititraus
			24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	
A/New Caledonia/20/99(H1N1)	'99	1998–1999	MDCK NP	MDCK MI	MDCK NP	MDCK MI	MDCK M1	MDCK M1	MDCK
			A549 NP	A549 MI	A549 NP	A549 MI	A549 M1	A549 M1	A549
			Vero E6 NP	Vero E6 MI	Vero E6 NP	Vero E6 MI	Vero E6 M1	Vero E6 M1	Vero E6
<u>A/California/07/09(H1N1pdm09)</u>	'09C	2009–2010	MDCK NP	MDCK MI	MDCK NP	MDCK MI	MDCK M1	MDCK M1	MDCK
			A549 NP	A549 MI	A549 NP	A549 MI	A549 M1	A549 M1	A549
			Vero E6 NP	Vero E6 MI	Vero E6 NP	Vero E6 MI	Vero E6 M1	Vero E6 M1	Vero E6
A/Fin/554/09(H1N1pdm09)	'09F	2009–2010	MDCK NP	MDCK MI	MDCK NP	MDCK MI	MDCK M1	MDCK M1	MDCK
			A549 NP	A549 MI	A549 NP	A549 MI	A549 M1	A549 M1	A549
			Vero E6 NP	Vero E6 MI	Vero E6 NP	Vero E6 MI	Vero E6 M1	Vero E6 M1	Vero E6
A/Fin/1614/13(H1N1pdm09)	'13	2012–2013	MDCK NP	MDCK MI	MDCK NP	MDCK MI	MDCK M1	MDCK M1	MDCK
			A549 NP	A549 MI	A549 NP	A549 MI	A549 M1	A549 M1	A549
			Vero E6 NP	Vero E6 MI	Vero E6 NP	Vero E6 MI	Vero E6 M1	Vero E6 M1	Vero E6
A/Turku/42/14(H1N1pdm09)	'14	2013–2014	MDCK NP	MDCK MI	MDCK NP	MDCK MI	MDCK M1	MDCK M1	MDCK
			A549 NP	A549 MI	A549 NP	A549 MI	A549 M1	A549 M1	A549
			Vero E6 NP	Vero E6 MI	Vero E6 NP	Vero E6 MI	Vero E6 M1	Vero E6 M1	Vero E6
A/Turku/577/16(H1N1pdm09)	'16	2015–2016	MDCK NP	MDCK MI	MDCK NP	MDCK MI	MDCK M1	MDCK M1	MDCK
			A549 NP	A549 MI	A549 NP	A549 MI	A549 M1	A549 M1	A549
			Vero E6 NP	Vero E6 MI	Vero E6 NP	Vero E6 MI	Vero E6 M1	Vero E6 M1	Vero E6
A/Turku/822/18(H1N1pdm09)	'18	2017–2018	MDCK NP	MDCK MI	MDCK NP	MDCK MI	MDCK M1	MDCK M1	MDCK
			A549 NP	A549 MI	A549 NP	A549 MI	A549 M1	A549 M1	A549
			Vero E6 NP	Vero E6 MI	Vero E6 NP	Vero E6 MI	Vero E6 M1	Vero E6 M1	Vero E6
A/Turku/107/19(H1N1pdm09)	'19	2019–2020	MDCK NP	MDCK MI	MDCK NP	MDCK MI	MDCK M1	MDCK M1	MDCK
			A549 NP	A549 MI	A549 NP	A549 MI	A549 M1	A549 M1	A549
			Vero E6 NP	Vero E6 MI	Vero E6 NP	Vero E6 MI	Vero E6 M1	Vero E6 M1	Vero E6
A/Turku/124/20(H1N1pdm09)	'20	2019–2020	MDCK NP	MDCK MI	MDCK NP	MDCK MI	MDCK M1	MDCK M1	MDCK
			A549 NP	A549 MI	A549 NP	A549 MI	A549 M1	A549 M1	A549
			Vero E6 NP	Vero E6 MI	Vero E6 NP	Vero E6 MI	Vero E6 M1	Vero E6 M1	Vero E6

4. POHDINTA

Influenssa A -virukset kykenevät infektoimaan ihmisen lisäksi useita muita eläinlajeja ja on mahdollista, että esimerkiksi linnun influenssavirus saa viruksessa tapahtuvan muuntelun kautta kyvyn tartuttaa uusia isäntäeläimiä. Joskus influenssavirus muuntautuu siten, että lajien väliset siirtymiset johtavat lopulta ihmisessä tapahtuvaan infektiin. Influenssa A -viruksen isäntätropismi määräytyy viruksen ja isäntäsolun tekijöiden välisten lajikohtaisten vuorovaikutusten perusteella. Näitä tekijöitä ovat viruksen kyky sitoutua isäntäsoluun, viruksen soluun sisään tunkeutuminen, viruksen RNA-genomin replikaatiotehokkuus isäntäsolun tumassa, isännän synnynnäisten immuunivasteiden välttäminen ja siirtymistehokkuus yksilöiden välillä. Kun uudessa influenssaviruksessa tapahtuu riittävästi ihmissoluun adaptoivia mutaatioita niin, että se kykenee tarttumaan tehokkaasti ihmisten välillä, voi tilanne johtaa pandemiaan. Ensimmäisten pandemia-aaltojen aikana suuri osa ihmisväestöstä saa tartunnan ja sen seurauksena immuniteetin uudelle virukselle, mutta ajan myötä pandeemisen viruksen muunnelmia ilmaantuu ja ne jatkavat leviämistään kausi-influenssaviruksina.

Tässä työssä tarkoituksena oli vertailevan tutkimuksen avulla havainnoida, onko A/H1N1pdm09:n replikaatiokyvyssä havaittavissa muutoksia kuluneen reilun kymmenen vuoden aikana siitä, kun virus ilmaantui influenssakaudella 2009–2010 ja aiheutti maailmanlaajuisen pandemian, joka sai kutsumanimen sikainfluenssa. Muutoksia havainnoitiin infektoimalla MDCK-, A549- sekä Vero E6 -soluja yhdeksällä eri IAV-kannalla, jotka kiersivät influenssakaudella 1998–1999 (yksi kanta) tai vuosien 2009 ja 2020 välillä (kahdeksan kantaa) (taulukko 1). Infektiokokeista saatuja tuloksia analysoitiin immunblottausmenetelmällä sekä RT-qPCR- ja plakkititrausmenetelmillä, minkä jälkeen muiden IAV-kantojen replikaatiokykyä verrattiin vuoden 2009 pandeemisen IAV-kannan '09C replikaatiokykyyn.

4.1 Työssä käytettyjen solulinjojen vaikutus tuloksiin

Tuloksissa nähdään melko suuriakin eroja tässä työssä käytettyjen solulinjojen välillä. Kanta '09F esimerkiksi replikoitui erityisen hyvin Vero E6 -soluissa, kun taas kannat '13, '14 ja '19 replikoituivat MDCK-soluissa paremmin kuin muissa solulinjoissa. Erityisen hyvin solulinjojen väliset erot tulivat esille plakkititrauksessa, kuten siinä, kuinka paljon

heikommin Vero E6 -soluissa replikoituneet viruskannat muodostivat plakkeja verrattuna MDCK- ja A549-soluissa replikoituneisiin viruskantoihin.

MDCK-solulinja on influenssatutkimuksessa eniten käytetty solulinja (Takada ym. 2019; ATCC 2021). Koska virusstokit oli kasvatettu ennen kananmunakasvatusta MDCK-soluissa, niiden tiedettiin jo ennen infektiokokeita replikoituvan näissä soluissa hyvin. Siten oletettiin, että kaikilla tässä työssä käytetyillä menetelmillä saataisiin mitattavia tuloksia kolmesta solulinjasta ainakin MDCK-soluilla, mikä osoittautuikin paikkansa pitäväksi. Kaikilla kolmella menetelmällä mitattuna erot viruskantojen välillä olivat pienimpiä MDCK-soluilla tehdyistä infektiosta saaduissa tuloksissa.

Myös A549-soluja käytetään yleisesti virustutkimuksessa ja koska ne ovat ihmisen keuhkoepiteelisoluja, ne sopivat erityisen hyvin hengitystievirusten tutkimiseen. Työssä käytetyt viruskannat replikoituivatkin tehokkaasti tässä solulinjassa. Tulokset olivat pääosin samansuuntaisia kuin ne tulokset, joita saatiin MDCK-soluilla tehdyistä infektiokokeista, mutta viruskantojen välillä erot olivat A549-soluissa korostuneempia.

Vero E6 -solulinja on myös yleisesti virustutkimuksessa käytetty solulinja, mutta tässä työssä IAV-kantojen havaittiin replikoituvan kyseisissä soluissa heikosti. IAV:ten kasvatustehosta Vero E6 -solulinjassa on ristiriitaista tietoa; Govorkova ym. (1995) on havainnut virusten kasvavan hyvin Vero E6 -soluissa, kun taas esimerkiksi Zuhairi ym. (2012) tekemässä tutkimuksessa IAV:t replikoituvat kyseisissä soluissa heikosti. Tämän työn tulokset tukevat Zuharin tutkimuksia; infektiokokeissa lähes kaikkien testattujen IAV-kantojen havaittiin replikoituvan Vero E6 -soluissa heikosti. Sekä Kaverin & Webster (1995) että Govorkova ym. (1995) tekemässä tutkimuksessa todettiin, että kasvatusmediumiin lisätyllä trypsiinillä on merkitystä Vero E6 -solujen kykyyn endosytoida ja tuottaa IAV:ia. Tässä työssä Vero E6 -solujen kasvatusmediumiin lisättiin trypsiiniä vain infektiokokeen alussa, joten trypsiinin merkitystä viruksen vähäiseen replikaatioon ei voida täysin pois sulkea. Toisaalta Zuhairi ym. (2012) tutkimuksessa trypsiinin ei havaittu tehostavan IAV:ien replikaatiokykyä Vero E6 -soluissa. Zuhairi ym. (2012) tutkimus viittaa heikon IAV:ien replikaatiokyvyn Vero E6 -soluissa johtuvan siitä, että solut ekspressoivat α -2,6-siaalihapposidoksen sisältäviä reseptoreita vain vähäisesti solukalvoillaan.

Yhteenvedon voidaan todeta, että kaikki viruskannat eivät näytä olevan yhtä hyvin mukautuvia eri solulinjoihin, mikä johtunee siitä, että eri isännästä peräisin olevissa solulinjoissa on vaihtelua glykosylaatiokoneistossa, aineenvaihdunnassa, entsyymiaktiivisuuksissa ja proteomitasoissa (Schwarzer ym. 2009; Ritter ym. 2010).

4.2 Erot A/H1N1pdm09-viruskantojen replikaatiokyvyssä

IAV-kantojen replikaatiokyvyssä havaittavat tehostumiseen viittaavat muutokset voisivat indikoida A/H1N1pdm09-viruksen adaptoituneen ihmiseen vuosien kuluessa. Tiedetään, että IAV:n adaptoituessa ihmiseen vähitellen antigeenisen ajautumisen kautta sen replikaatiokyky tehostuu, patogeenisten ominaisuuksien vaihdellessa riippuen mutaatioiden tyypistä (Carrat & Flahault 2007; Reperant ym. 2012; Elderfield ym. 2014).

Elderfield ym. havaitsivat, että Yhdistyneessä kuningaskunnassa kiertäneessä A/H1N1pdm09-viruksessa tapahtui juuri tällaisia replikaatiokykyä tehostavia mutaatioita viruksen kiertäessä kolmena epidemia-aaltona influenssakausien 2009–2011 aikana. Mutaatioita tapahtui viruksen NS-proteiinia koodaavassa geenisegmentissä, mikä johti NS1-proteiinin tehokkaampaan kykyyn vaimentaa isäntäsolun interferonivasteita ja siten viruksen tehokkaampaan immuunivasteen väistämiseen. Mutaatiot HA- ja NA-proteiineja koodaavissa geeneissä taas johtivat siihen, että virus kykeni sitoutumaan aiempaa paremmin α -2,6-siaalihapporeseptoreihin ja siten infektoimaan entistä tehokkaammin ihmisen hengitysteiden soluja. PA-geenissä tapahtunut pistemutaatio johti viruksen kohonneeseen polymeraasiaktiivisuuteen ja siten tehokkaampaan transkriptio- ja replikaatiokykyyn. Näiden kumulatiivisten mutaatioiden ansiosta A/H1N1pdm09 replikoitui jo kolmannessa tautiaallossa vuonna 2011 tehokkaammin ja aiheutti myös enemmän vakavia tautitapauksia kuin pandemian alussa vuonna 2009.

Tässä tutkimuksessa vuoden 2009 jälkeen kiertäneissä A/H1N1pdm09-kannoissa ei havaittu selkeitä, edellä kuvattuja replikaation tehostumiseen viittaavia suoralinjaisia muutoksia. Influenssakausina 2009–2010, 2013–2014 ja 2019–2020 kiertäneet A/H1N1pdm09-kannat '09F, '14 ja '19 tuottivat suurimmaksi osin vasta 48 aikapisteen kohdalla yhtä korkeita tai korkeampia tuloksia kuin vertailukanta '09C 24 tunnin aikapisteesä. Tämä päti sekä proteiiniykspressioon että vRNA:n tuottoon kaikilla kolmella solulinjalla. Myös plakkititrauksessa, lukuun ottamatta kannan '19 tuloksia, muut kannat tuottivat vertailukantaa '09C matalampia tuloksia. Toisin sanoen kannat '09F, '14 ja '19

olivat jonkin verran hitaampia replikoitumaan kuin kanta '09C. On tärkeää todeta, että '09C-viruskanta on valittu rokotevirukseksi juuri sen hyvän lisääntymiskyvyn takia.

Ainoastaan kanta '20, joka myös kiersi influenssakaudella 2019–2020, tuotti kaikilla solulinjoilla yhtä korkeita tai korkeampia vRNA- ja proteiinimääriä verrattuna kantaan '09C. Tämä on kiinnostava tulos, joka viittaa siihen, että replikaatiokyvyn tehostumista on kuitenkin todellakin tapahtunut vuosien aikana. Tähän johtopäätökseen ei kuitenkaan täysin sovi plakkititrauksen havainto, että kanta '20 tuotti kaikissa solulinjoissa selkeästi kantaa '09C vähemmän plakkeja eli vähemmän infektiivisiä virioneja. Tämä tarkoittaa siis sitä, että kanta '20 replikoitui kantaa '09C hitaammin. Lisäksi on yllättävää, että A549- ja Vero E6 -solulinjoilla kantaa '09C hitaammin replikoitunut kanta '19 on eristetty ja kasvatettu samalla influenssakaudella eristetyistä potilasnäytteistä kuin suurimaksi osin tehokkaasti replikoituva kanta '20. Siten kannan '20 tehokkaassa replikaatiokyvyssä kyse saattaa tosiasiansa olla yksittäisen potilasnäytteestä eristetyn A/H1N1pdm09-viruskannan yksilöllisistä ominaisuuksista. Lisäksi influenssakauden 2017–2018 kanta '18 tuotti vielä kantaa '19 vähäisempiä viruksen RNA ja proteiinimääriä kaikilla menetelmillä ja kaikissa solulinjoissa tarkasteltuna. Influenssakaudella 2012–2013 kiertänyt kanta '13 tuotti niin ikään hyvin paljon matalampia tuloksia kuin kanta '09C kaikilla muilla solulinjoilla, paitsi MDCK:illa. Siten voidaan sanoa, että kannat '13 ja '18 olivat selkeästi hitaampia replikoitumaan kuin kanta '09C. Kuten kannan '20 kohdalla, myös kantojen '13 ja '18 kohdalla saattaa kyse kuitenkin olla yksittäisten potilasnäytteistä eristettyjen viruskantojen poikkeavista ominaisuuksista.

Tulosten analyysin aikana heräsi epäily, että influenssakauden 2015–2016 IAV-kannan '16 stokkikasvatuksen tiitteri ei pitänyt paikkaansa, joten stokkikasvatuksen tiitteri tarkistettiin plakkititrauksella. Tulos osoitti virustiitterin olleen huomattavasti alhaisempi kuin mitä oli alun perin ilmoitettu. Ilmoitettua matalamman tiitterin vuoksi infektiokokeisiin laskettu MOI-arvo ei todellisuudessa ollut '16 viruskannan kohdalla sama kuin muilla viruskannoilla, vaan selkeästi matalampi. Tämä saattaa selittää ainakin osittain kannan '16 havaitut erittäin matalat arvot infektiokokeissa kaikilla kolmella solulinjalla. Joka tapauksessa kannalla '16 tehdyistä infektiokokeista saadut tulokset eivät ole vertailukelpoisia muiden kantojen kanssa, minkä vuoksi ne on jätetty pois tarkemmasta tulosten pohdinnasta. Kantojen väliset teknisistä seikoista johtuvat erot pyrittiin muutoin minimoimaan muun muassa siten, että kaikki IAV-stokit sulatettiin yhtä monta kertaa, koska

jokainen uudelleenpakastus- ja sulatuskerta saattaa vaikuttaa virusstokin tiitteriä alenta-
vasti (Greiff ym. 1954; Nazir ym. 2010).

Kannalla '09F tehdyistä infektiosta analysoidut tulokset ovat kokonaisuutena mielen-
kiintoiset, sillä kanta on kerätty pandemian alussa samalla influenssakaudella kuin kanta
'09C. Ainoa ero kantojen välillä on se, että '09C on eristetty Kaliforniassa ja '09F Hel-
singissä. Työssä saatuja tuloksia voitaisiin siten myös verrata kannan '09C:n sijaan yhtä
hyvin kantaan '09F, etenkin koska työssä käytetyt influenssakauden 2009–2010 jälkeen-
kin kiertäneet viruskannat oli kerätty joko Helsingissä tai Turussa. Kantaan '09C verrat-
tuna '09F tuotti IAV-proteiineja sekä vRNA:ta selkeästi heikommin A549-soluissa ja toi-
saalta Vero E6 -soluissa proteiinituotto oli selkeästi korkeampi. Ehkä suurin kantojen vä-
linen ero havaittiin plakkititrauksessa, jonka tulosten mukaan kanta '09F ei tuota ollen-
kaan infektiivisiä viruksia MDCK- tai Vero E6 -soluissa. A549-soluissakin plakit olivat
häidin tuskin havaittavia, kun taas kanta '09C tuotti selkeitä ja suuria plakkeja kaikissa
solulinjoissa.

Influenssakaudella 1998–1999 kiertänyt IAV-kanta '99 valittiin tutkimukseen mukaan,
koska sen tiedettiin rokotekantaviruksena replikoituvan tehokkaasti. Lisäksi kanta on
H1N1-influenssavirus ajalta ennen vuoden 2009 pandemiaa ja edustaa siten eri fyloge-
neettistä haaraa kuin A/H1N1pdm09-viruskannat. Kanta '99 ekspressoii immunoblottauk-
sen perusteella NP-proteiinia jo 24 tunnin aikapisteessä ja edelleen 48 tunnin aikapis-
teessä yhtä tehokkaasti tai jopa tehokkaammin kuin kanta '09C. Kuitenkin sekä M1-eks-
pression että virionien tuoton perusteella '99 replikoitui hitaammin kuin kanta '09C. Ai-
noastaan Vero E6 -soluissa vRNA:n tuotto oli korkeampaa kuin kannalla '09C, mutta
vasta 48 tunnin aikapisteessä.

4.3 Plakkien fenotyypit

Plakkititrauksessa osa kannoista tuotti fenotyypiltään pienempiä ja rajoiltaan epäselke-
ämpiä plakkeja kuin kanta '09C. Utuisten ja epäselkeärajaisten plakkien fenotyyppiin vai-
kuttaa useampi tekijä, joiden tarkempi analyysi vaatii plakkimorfologiaan keskittyneitä
lisätutkimuksia. Yleisesti voidaan kuitenkin todeta, että plakkien suuri määrä kertoo näyt-
teen sisältävän paljon virioneja kun taas plakkien pieni koko viittaa hitaampaan replikoi-
tumiseen tai ongelmiin viruksen leviämässä solusta toiseen verrattuna kantaan '09C.

Tämä saattaa johtua siitä, että ne ovat mahdollisesti olleet HA- ja NA-proteiineiltaan erilaisia kuin '09C tai muut isoja plakkeja tuottaneet kannat (Cattoli ym. 2003).

4.4 Jatkotutkimusmahdollisuudet

Tämän vertailevan tutkimuksen tarkoituksena oli tuoda esiin eroja vuoden 2009 jälkeen kiertäneissä A/H1N1pdm09-kannoissa verrattuna vuoden 2009 pandeemiseen kantaan luoden samalla pohjaa jatkotutkimuksille. Replikaatiotehokkuuden ja adaptaatiomekanismien tarkempaa havainnointia voitaisiin seuraavaksi tehdä tutkimuksissa, joissa tarkastellaan A/H1N1pdm09-viruskantojen kinetiikkaa sekä solulinjoilla, kuten A549- tai MDCK-soluilla, että ihmisen verestä eristetyillä primäärisoluilla, kuten dendriitti- ja makrofagisolulla. Primäärisolujen avulla voidaan tarkastella eri kantojen ihmisessä herättämää immuunivastetta, mikä antaa suuntaa antavaa tietoa viruksen patogeenisuudesta. Tarkasteltavat aikapisteet voisivat olla esimerkiksi 0, 12, 24, 48 sekä 72 tuntia infektiosta. Analysoitaessa tämän työn infektiokokeiden tuloksia RT-qPCR:llä havaittiin, että heti solujen infektoimisen jälkeen eli 0 tunnin aikapisteessä kannalta '09C kerätyssä näyteessä oli havaittavissa vRNA:ta. Koska replikaatiosykli ei ole tässä ajassa vielä ehtinyt edetä siihen, että uutta virusmateriaalia olisi jo tuottanut, on kyseessä kasvatusmediumiin PBS-pesujen jälkeen jääneistä stökkikasvatuksesta peräisin olevista viruksista. Tämä vRNA tulisi huomioida tulosten analyysissa niiden todellisena lähtötasona, minkä vuoksi olisi hyödyllistä kerätä näyte jokaiselta viruskannalta tästä aikapisteestä. Tämän työn tulosten perusteella voidaan valita jatkotutkimukseen mielenkiintoisimmat tarkasteltavat influenssakaudet, joita voisivat olla esimerkiksi kaudet 2009–2010, 2013–2014 ja 2019–2020.

Tärkeää lisätietoa saadaan myös siitä, jos seuraavaksi tässä työssä käytettyjen virusten sekvenssejä vertaillaan niihin samalla influenssakaudella esiintyneisiin viruskantoihin, joista on julkaistu koko viruksen sekvenssi. Siten saadaan viitteitä siitä, kuinka hyvin tässä työssä käytetty viruskanta edustaa kyseisellä influenssakaudella maailmaa kiertäneitä A/H1N1pdm09-kantoja. Lisäksi genotyyppauksen avulla voitaisiin havainnoida esimerkiksi kantojen NS-, HA-, NA-, ja PA-geenien rakennetta, mahdollisia eroavaisuuksia kantojen välillä ja samankaltaisuuksia Elderfield ym. (2014) löytämiin geneettisiin muutoksiin A/H1N1pdm09-kannoissa.

Tässä työssä replikaatiosykliä tarkasteltiin kahdesta eri näkökulmasta: kuinka hyvin IAV:t replikoituvat solun sisällä ja kuinka hyvin ne tuottavat uusia jälkeläisvirioneja ulos solusta. Kuitenkin koska soluun sisällepääsy on yksi tärkeä viruksen tropismia rajoittava tekijä ja siten tärkeä adaptaatiomekanismien kohde, voisi tätäkin replikaatiosyklin vai-

hetta tarkastella jatkotutkimuksissa tarkemmin (Reperant ym. 2012). Viruksen soluun sisällepääsyn analysoimiseen eri aikapisteissä voitaisiin käyttää esimerkiksi epäsuoraa immunofluoresenssiä eli IFA-menetelmää (*engl.* indirect immunofluorescence assay).

4.5 Tutkimustulosten merkitys

Influenssa on sekä kansanterveydellisesti että -taloudellisesti merkittävä tauti: IAV aiheuttaa pelkästään Euroopassa ihmisissä vuosittain miljoonia sairastapauksia ja kymmeniä tuhansia kuolemia, ja lisäksi useista linnuissa esiintyneistä tautitapauksista seuraneita miljoonien siipikarjalintujen teurastuksia maailmanlaajuisesti (Alexander 2007; THL 2020). IAV:issa tapahtuvan jatkuvan antigeenisen muuntumisen seurauksena on olemassa riski siihen, että IAV saa reassortation seurauksena kyvyn siirtyä linnuista taioista ihmiseen, jossa virus saattaa olla erittäin korkeapatogeeninen. Samalla on olemassa riski maailmanlaajuisen pandemian syntyyn. Pandemiaan johtavien antigeenisten muutosten on arvioitu tapahtuvan tyypillisesti 10–40 vuoden välein, mikä täsmää viimeisen sadan vuoden aikana tapahtuneiden pandemioiden aikajanaan (Potter 2001).

Influenssan aiheuttamien yhteiskunnallisten vaikutusten sekä pandemioiden aiheuttaman jatkuvan uhan vuoksi IAV:issa tapahtuvien muutosten ja adaptiivisten mekanismien tunteminen on tärkeää, koska se voi auttaa sekä uuteen influenssapandemiaan valmistautumisessa että sellaisen alkaessa siihen nopeasti ja oikein reagoimisessa. Vaikka A/H1N1pdm09:ssä tapahtuneista adaptaatiosta ei tässä työssä saatu yksiselitteistä havaintoa, antoivat tulokset onnistuneesti pohjaa tuleville tutkimuksille, joissa pyritään selvittämään adaptaation mekanismeja tarkemmin.

KIITOKSET

Tahdon kiittää ohjaajiani Laura Kakkolaa ja Ilkka Julkusta asiantuntevasta ohjauksesta ja mahdollisuudesta tehdä tämä pro gradu -työ, sekä koko Julkusen tutkimusryhmää arvokkaista avusta ja neuvoista. Kiitän myös Sigrid Juséliuksen säätiötä rahoituksesta. Kiitän lämpimästi Tiina Henttistä sekä tutkielman ohjauksesta että koko opiskelunaikaisesta kannustuksesta. Lisäksi kiitän Moona Huttusta sekä työn kirjallisesta että käytännön ohjauksesta ja erityisesti viisaista elämänohjeista. Olen kiitollinen Rickardille ja kaikille muille läheisilleni korvaamattomasta tuesta, kärsivällisyydestä sekä sen ajoittaisesta muistuttamisesta, mitä kaikkea mukavaa opiskelun ja työn ulkopuolisellakin vapaa-ajalla voi tehdä.

LÄHTEET

Alexander D.J. (2007) Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, Africa, and Australasia, 2002-2006. *Avian Diseases* 51: 161–166.

Amorim M.J., Bruce E.A., Read E.K.C., Foeglein Á., Mahen R., Stuart A.D. & Digard P. (2011) A Rab11- and Microtubule-Dependent Mechanism for Cytoplasmic Transport of Influenza A Virus Viral RNA. *Journal of Virology* 85: 4143–4156.

ATCC (2021) MDCK (NBL-2) <<https://www.atcc.org/products/ccl-34#detailed-product-information>> [Luettu: 3.7.2021]

Broszeit F., Tzarum N., Zhu X., Nemanichvili N., Eggink D., Leenders T., Li Z., Liu L., Wolfert M.A., Papanikolaou A., Martínez-Romero C., Gagarinov I.A., Yu W., García-Sastre A., Wennekes T., Okamatsu M., Verheije M.H., Wilson I.A., Boons G.J. & de Vries R.P. (2019) N-Glycolylneuraminic Acid as a Receptor for Influenza A Viruses. *Cell Reports* 27: 3284-3294.

Carrat F. & Flahault A (2007) Influenza vaccine: The challenge of antigenic drift. *Vaccine* 25: 6852–6862.

Cattoli G., Brasola V. & Capua I. (2003) Plaque morphology of Italian H7N1 LPAI isolates in MDCK cells and in primary cells of different avian species. *Avian Diseases* 47: 1161–1163.

CDC (1997) Isolation of Avian Influenza A(H5N1) Viruses from Humans -- Hong Kong, May-December 1997. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 46: 1204–1207.

CDC (2009) Swine Influenza A (H1N1) Infection in Two Children --- Southern California, March--April 2009. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 58: 400–402.

CDC (2015) Transmission of Avian Influenza A Viruses Between Animals and People <<https://www.cdc.gov/flu/avianflu/virus-transmission.htm>> [Luettu: 21.9.2021]

CDC (2017) Influenza. Type A Viruses <<https://www.cdc.gov/flu/avianflu/influenza-a-virus-subtypes.htm#Subtypes>> [Luettu: 30.6.2021]

CDC (2018) Highly Pathogenic Avian Influenza A (H5N1) Virus <<https://www.cdc.gov/flu/avianflu/h5n1-virus.htm>> [Luettu: 20.9.2021]

Chen H., Yuan H., Gao R., Zhang J., Wang D., Xiong Y., Fan G., Yang F., Li X., Zhou J., Zou S., Yang L., Chen T., Dong L., Bo H., Zhao X., Zhang Y., Lan Y., Bai T., Dong J., Li Q., Wang S., Zhang Y., Li H., Gong T., Shi Y., Ni X., Li J., Zhou J., Fan J., Wu J., Zhou X., Hu M., Wan J., Yang W., Li D., Wu G., Feng Z., Gao G.F., Wang Y., Jin Q., Liu M. & Shu Y. (2014) Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection: A descriptive study. *The Lancet* 383: 714–721.

Chromoscience (2020) The Antigenic Variation in Viruses <<https://chromoscience.com/the-antigenic-variation-in-viruses/>> [Luettu: 3.11.2021]

Dawood F.S., Iuliano A.D., Reed C., Meltzer M.I., Shay D.K., Cheng P.Y., Bandaranayake D., Breiman R.F., Brooks W.A., Buchy P., Feikin D.R., Fowler K.B., Gordon A., Hien N.T., Horby P., Huang Q.S., Katz M.A., Krishnan A., Lal R., Montgomery J.M., Mølbak K., Pebody R., Presanis A.M., Razuri H., Steens A., Tinoco Y.O., Wallinga J., Yu H., Vong S., Bresee J. & Widdowson M.A. (2012) Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: A modelling study. *The Lancet Infectious Diseases* 12: 687–695.

Dawood F.S., Jain S., Finelli L., Shaw M.W., Lindstrom S., Garten R.J., Gubareva L., Xu X., Bridges C.B. & Uyeki T.M. (2009) Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans. *New England Journal of Medicine* 360: 2605–2615.

Du R., Cui Q. & Rong L. (2019) Competitive cooperation of hemagglutinin and neuraminidase during influenza a virus entry. *Viruses* 11: 458.

Elderfield R.A., Watson S.J., Godlee A., Adamson W.E., Thompson C.I., Dunning J., Fernandez-Alonso M., Blumenkrantz D., Hussell T., Zambon M., Openshaw P., Kellam P. & Barclay W.S. (2014) Accumulation of Human-Adapting Mutations during Circulation of A(H1N1)pdm09 Influenza Virus in Humans in the United Kingdom. *Journal of Virology* 88: 13269–13283.

Fimea (2020) <<https://www.fimea.fi/ammattilaiset/influenssa/pandemia>> [Luettu: 21.8.2021]

Fodor E. (2013) The RNA polymerase of influenza A virus: Mechanisms of viral transcription and replication. *Acta Virologica* 57: 113–122.

Franco-Paredes C., Hernandez-Ramos I., del Rio C., Alexander K.T., Tapia-Conyer R. & Santos-Preciado J.I. (2009) H1N1 influenza pandemics: Comparing the events of 2009 in Mexico with those of 1976 and 1918-1919. *Archives of Medical Research* 40: 669–672.

Gao S., Wang S., Cao S., Sun L., Li J., Bi Y., Gao G.F. & Liu W. (2014) Characteristics of Nucleocytoplasmic Transport of H1N1 Influenza A Virus Nuclear Export Protein. *Journal of Virology* 88: 7455–7463.

Garten R.J., Todd Davis C., Russell C.A., Shu B., Lindstrom S., Balish A., Sessions W.M., Xu X., Skepner E., Deyde V., Okomo-Adhiambo M., Gubareva L., Barnes J., Smith C.B., Emery S.L., Hillman M.J., Rivaller P., Smagala J., de Graaf M., Burke D.F., M Fouchier R.A., Pappas C., Alpuche-Aranda C.M., López-Gatell H., Olivera H., López I., Myers C.A., Faix D., Blair P.J., Yu C., Keene K.M., David Dotson Jr P., Boxrud D., Sambol A.R., Abid S.H., St George K., Bannerman T., Moore A.L., Stringer D.J., Blevins P., Demmler-Harrison G.J., Ginsberg M., Kriner P., Waterman S., Smole S., Guevara H.F., Belongia E.A., Clark P.A., Beatrice S.T., Donis R., Katz J., Finelli L., Bridges C.B., Shaw M., Jernigan D.B., Uyeki T.M., Smith D.J., Klimov A.I. & Cox N.J. (2009) Antigenic and Genetic Characteristics of Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Viruses Circulating in Humans. *Science* 325: 197–201.

Gorbalenya A.E., Krupovic M., Mushegian A., Kropinski A.M., Siddell S.G., Varsani A., Adams M.J., Davison A.J., Dutilh B.E., Harrach B., Harrison R.L., Junglen S., King A.M.Q., Knowles N.J., Lefkowitz E.J., Nibert M.L., Rubino L., Sabanadzovic S., Sanfaçon H., Simmonds P., Walker P.J., Zerbini F.M. & Kuhn J.H. (2020) The new scope of

- virus taxonomy: partitioning the virosphere into 15 hierarchical ranks. *Nature Microbiology* 5: 668–674.
- Govorkova E.A., Kaverin N. v, Gubareva L. v, Meignier B. & Webster R.G. (1995) Replication of Influenza A Viruses in a Green Monkey Kidney Continuous Cell Line (Vero). *The Journal of Infectious Diseases* 172: 250–253.
- Greiff D., Blumenthal H., Chiga M. & Pinkerton H. (1954) The Effects on Biological Materials of Freezing and Drying by Vacuum Sublimation II. Effect on Influenza Virus. *Journal of Experimental Medicine* 100: 89–101.
- Johnson N.P.A.S. & Mueller J. (2002) Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 “Spanish” influenza pandemic. *Bulletin of the History of Medicine* 76: 105–115.
- Kaji M., Watanabe A. & Aizawa H. (2003) Differences in clinical features between influenza A H1N1, A H3N2, and B in adult patients. *Respirology* 8: 231–233.
- Kakkola L., Ikonen N. & Julkunen I. (2021) Influenza A Viruses (*Orthomyxoviridae*). Teoksessa: *Encyclopedia of Virology, 4th Edition*, s. 551–560. Academic Press, Oxford.
- Kilbourne E.D. (2006) Influenza Pandemics of the 20th Century. *Emerging Infectious Diseases* 12: 9–14.
- Klemm C., Boergeling Y., Ludwig S. & Ehrhardt C. (2018) Immunomodulatory Non-structural Proteins of Influenza A Viruses. *Trends in Microbiology* 26: 624–636.
- Krammer F., Smith G.J.D., Fouchier R.A.M., Peiris M., Kedzierska K., Doherty P.C., Palese P., Shaw M.L., Treanor J., Webster R.G. & García-Sastre A. (2018) Influenza. *Nature Reviews Disease Primers* 4: 1–21.
- Li J., Yu M., Zheng W. & Liu W. (2015) Nucleocytoplasmic shuttling of influenza A virus proteins. *Viruses* 7: 2668–2682.
- Linnanmäki E. (2005) *Espanjantauti Suomessa. Influenssapandemia 1918–1920, Bibliotheca Historica 95*. Suomalaisuuden Kirjallisuuden Seura, Helsinki.
- Long J.S., Mistry B., Haslam S.M. & Barclay W.S. (2019) Host and viral determinants of influenza A virus species specificity. *Nature Reviews Microbiology* 17: 67–81.
- Loosli C.G. & Langmuir A.D. (1961) Global Epidemiology of Asian Influenza with Special Emphasis on the United States. *The American Review of Respiratory Disease* 83: 2–14.
- Lumio J. (2021) Sikainfluenssa-pandemia 2009–2010 ja rokotuksia seurannut narkolepsia. *Lääkärikirja Duodecim* <<https://www.terveyskirjasto.fi/dlk00908>> [Luettu: 31.8.2021]
- Lyytikäinen O., Kuusi M., Snellman M., Virtanen M.J., Rönkkö E., Ikonen N., Ziegler T., Julkunen I., Eskola J. & Ruutu P. (2010) Influenssa A(H1N1)v -epidemian valtakunnalliset seurantatulokset. *Suomen Lääkärilehti* 65: 1995–2001.

Lyytikäinen O., Kuusi M., Toikkanen S., Virtanen M.J., Rönkkö E., Strengell M., Ikonen N., Ziegler T., Ruutu P. & Julkunen I. (2011) Influenssa A(H1N1) 2009 -pandemian toinen epidemia-aalto aiheutti vähemmän kuolemia ja tehohoidon tarvetta. *Suomen Lääkäri-lehti* 66: 2925–2930.

Ma M.J., Yang X.X., Qian Y.H., Zhao S.Y., Hua S., Wang T.C., Chen S.H., Ma G.Y., Sang X.Y., Liu L.N., Wu A.P., Jiang T.J., Gao Y.W., Gray G.C., Zhao T., Ling X., Wang J.L., Lu B., Qian J. & Cao W.C. (2014). Characterization of a novel reassortant influenza A virus (H2N2) from a domestic duck in eastern China. *Scientific Reports* 4: 7588.

Mancera Gracia J.C. (2017) Novel insights in the adaptation of avian H9N2 influenza viruses to swine. *PhD thesis, Ghent University, Belgium.*

McCullers J.A. (2016) The Role of Punctuated Evolution in the Pathogenicity of Influenza Viruses. *Microbiology Spectrum* 4

Mehle A., Dugan V.G., Taubenberger J.K. & Doudna J.A. (2012) Reassortment and Mutation of the Avian Influenza Virus Polymerase PA Subunit Overcome Species Barriers. *Journal of Virology* 86: 1750–1757.

Melén K., Kinnunen L., Fagerlund R., Ikonen N., Twu K.Y., Krug R.M. & Julkunen I. (2007) Nuclear and Nucleolar Targeting of Influenza A Virus NS1 Protein: Striking Differences between Different Virus Subtypes. *Journal of Virology* 81: 5995–6006.

Nayak D.P., Hui E.K.W. & Barman S. (2004) Assembly and budding of influenza virus. *Virus Research* 106: 147–165.

Nazir J., Haumacher R., Abbas M.D. & Marschang R.E. (2010) Use of filter carrier technique to measure the persistence of avian influenza viruses in wet environmental conditions. *Journal of Virological Methods* 170: 99–105.

Nobusawa E. & Sato K. (2006) Comparison of the Mutation Rates of Human Influenza A and B Viruses. *Journal of Virology* 80: 3675–3678.

O'Neill R.E., Talon J. & Palese P. (1998) The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *The EMBO Journal* 17: 288–296.

Pathlab (2019) New Respiratory Viruses, Pertussis and Measles Swab Collection Media <<https://www.pathlab.co.nz/news/2019-06-12-respiratory-virus-pertussis-measles-collection-media/>> [Luettu: 5.10.2021]

Peiris M., Yuen K., Leung C., Chan K., Ip P., Lai R., Orr W. & Shortridge K. (1999) Human infection with influenza H9N2. *The Lancet* 354: 916–917.

Pellett P.E., Mitra S. & Holland T.C. (2014) Basics of virology. Teoksessa: *Handbook of Clinical Neurology, Vol. 123.*, s. 45–66. Elsevier Science & Technology.

Potter C.W. (2001) A history of influenza. *Journal of Applied Microbiology* 91: 572–579.

Price G.E., Gaszewska-Mastarlarz A. & Moskophidis D. (2000) The Role of Alpha/Beta and Gamma Interferons in Development of Immunity to Influenza A Virus in Mice. *Journal of Virology* 74: 3996–4003.

- Pyhälä R. (2000) Hongkongilaisen influenssaviruksen jälkipolvet Suomessa – 30 vuotta kujanjuoksua ja perässä pysyttelyä. *Duodecim* 116: 2483–2488.
- Reperant L.A., Kuiken T. & Osterhaus A.D.M.E. (2012) Adaptive pathways of zoonotic influenza viruses: From exposure to establishment in humans. *Vaccine* 30: 4419–4434.
- Ritter J.B., Wahl A.S., Freund S., Genzel Y. & Reichl U. (2010) Metabolic effects of influenza virus infection in cultured animal cells: Intra- and extracellular metabolite profiling. *BMC Systems Biology* 4: 61.
- Samji T. (2009) Influenza A: Understanding the Viral Life Cycle. *Yale Journal of Biology and Medicine* 82: 153–159.
- Sanjuán R. & Domingo-Calap P. (2016) Mechanisms of viral mutation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73: 4433–4448.
- Schwarzer J., Rapp E., Hennig R., Genzel Y., Jordan I., Sandig V. & Reichl U. (2009) Glycan analysis in cell-culture based influenza vaccine production: influence of host cell line and virus strain on the glycosylation pattern of viral hemagglutinin. *Vaccine* 27: 4325–36.
- Schäfer J.R., Kawaoka Y., Bean W.J., Süß J., Senne D. & Webster R.G. (1993) Origin of the Pandemic 1957 H2 Influenza A Virus and the Persistence of Its Possible Progenitors in the Avian Reservoir. *Virology* 194: 781–788.
- Shao W., Li X., Goraya M.U., Wang S. & Chen J.L. (2017) Evolution of influenza a virus by mutation and re-assortment. *International Journal of Molecular Sciences* 18: 1650.
- Simonsen L., Clarke M.J., Schonberger L.B., Arden N.H. & Cox N.J. (1998) Pandemic versus Epidemic Influenza Mortality: A Pattern of Changing Age Distribution. *The Journal of Infectious Diseases* 178: 53–60.
- Song W. & Qin K. (2020) Human-infecting influenza A (H9N2) virus: A forgotten potential pandemic strain? *Zoonoses and Public Health* 67: 203–212.
- Spackman E. & Killian M.L. (2020) Methods in Molecular Biology. Teoksessa: *Animal Influenza Virus. Methods and Protocols. Third Edition*, s. 157. Humana Press, Totowa.
- Stubbs T.M. & te Velthuis A.J.W. (2014) The RNA-dependent RNA polymerase of the influenza A virus. *Future Virology* 9: 863–876.
- Takada K., Kawakami C., Fan S., Chiba S., Zhong G., Gu C., Shimizu K., Takasaki S., Sakai-Tagawa Y., Lopes T.J.S., Dutta J., Khan Z., Kriti D., van Bakel H., Yamada S., Watanabe T., Imai M. & Kawaoka Y. (2019) A humanized MDCK cell line for the efficient isolation and propagation of human influenza viruses. *Nature Microbiology* 4: 1268–1273.
- Taubenberger J.K. (1998) Commentary Influenza virus hemagglutinin cleavage into HA1, HA2: No laughing matter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 9713–9715.

- Taubenberger J.K. & Morens D.M. (2009) Pandemic influenza-including a risk assessment of H5N1. *Revue Scientifique et Technique* 28: 187–202.
- THL (2020) Influenssa <<https://thl.fi/fi/web/infektioaudit-ja-rokotukset/audit-ja-torjunta/audit-ja-taudinaiheuttajat-a-o/influenssa>> [Luettu: 30.7.2021]
- Tognotti E. (2009) Emerging Problems in Infectious Diseases Influenza pandemics: a historical retrospect. *The Journal of Infection in Developing Countries* 3: 331–334.
- Viboud C., Grais R.F., Lafont B.A.P., Miller M.A. & Simonsen L. (1968) Multinational Impact of the 1968 Hong Kong Influenza Pandemic: Evidence for a Smoldering Pandemic. *The Journal of Infectious Diseases* 192: 233–48.
- Viboud C., Simonsen L., Fuentes R., Flores J., Miller M.A. & Chowell G. (2015) Global mortality impact of the 1957-1959 influenza pandemic. *The Journal of Infectious Diseases* 212: 738–745.
- WHO (2018a) Human infection with avian influenza A (H7N9) virus – China: Update <<https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/05-september-2018-ah7n9-china-en>> [Luettu: 4.9.2021]
- WHO (2018b) Influenza (Seasonal) <[https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))> [Luettu: 30.7.2021]
- Wolff T. & Veit M. (2021) Influenza B, C and D Viruses (*Orthomyxoviridae*). Teoksessa: *Encyclopedia of Virology, 4th Edition*, s. 561–574. Academic Press, Oxford.
- Woolhouse M., Scott F., Hudson Z., Howey R. & Chase-Topping M. (2012) Human viruses: Discovery and emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367: 2864–2871.
- Yamashita M., Krystal M., Fitch W.M. & Palese P. (1988) Influenza B Virus Evolution: Co-circulating Lineages and Comparison of Evolutionary Pattern with those of Influenza A and C Viruses. *Virology* 163: 112–122.
- Yang L., Zhao X., Li X., Bo H., Li D., Liu J. & Wang D. (2020) Case report for human infection with a highly pathogenic avian influenza A(H5N6) virus in Beijing, China 2019. *Biosafety and Health* 2: 49–52.
- Zamstelskaja L.J., Yakhno M.A., Isa6enko V.A., Molubog E. v, Hlustov S.A., Antonova I. v, Kurtsunova N. v, Vorkunova G.K., Bukrinskaja A.G., Bycovsky A.F., Hohlova G.G., Ivanova V.T. & Zdanov V.M. (1978) Influenza in the USSR in 1977: recurrence of influenza virus A subtype HI N *. *Bulletin of the World Health Organization* 56: 919–922.
- Zhou X., Gao L., Wang Y., Li Y., Zhang Y., Shen C., Liu A., Yu Q., Zhang W., Pekin A., Guo F., Smith C., Clements A.C.A., Edwards J., Huang B. & Soares Magalhães R.J. (2020) Geographical variation in the risk of H7N9 human infections in China: implications for risk-based surveillance. *Scientific Reports* 10: 10372.
- Zuhairi F.R., Maharani & Tan M.I. (2012). The role of trypsin in the internalization process of influenza H1N1 virus into vero and MDCK cells. *ITB Journal of Science* 44A: 297–307.