Influensavirus A(H1N1) pandemi 2009 - studie av virusets egenskaper og vertsrespons i en tidlig pandemifase.

Influenzavirus A(H1N1) pandemic 2009 - a study of viral properties and host response in an early phase of pandemic.

Navn: May Tove Furuseth

Universitetet for miljø- og biovitenskap
Institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap
Masteroppgave 60 stp. 2012

Forord

Denne oppgaven er skrevet som en avsluttende mastergrad ved Institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap ved Universitetet for Miljø- og Biovitenskap (UMB). Arbeidet med oppgaven er utført ved seksjon for genteknologi ved Tverrfaglig laboratoriemedisin og Medisinsk biokjemi ved Akershus Universitetssykehus, i perioden september 2009 til mai 2012.

Dette studiet har vært en utfordrende og lærerik modningsprosess. Dette har vært en unik sjanse til å fordype seg i et omfattende og spennende fagfelt. For å kunne fullføre denne mastergraden har jeg fått god hjelp. Først og fremst vil jeg rette en stor takk til min veileder, Christine M Jonassen. Takker for at hun har inkludert meg i sin forskning, vært en faglig inspirator og hjulpet meg gjennom praktiske og faglige problemstillinger. Takk til veileder ved UMB, Leiv Sigve Håvarstein. Stor takk til alle mine gode kollegaer ved seksjon for genteknologi. En spesiell takk til kollega Vahid Bemanian som til tross for en vanskelig sykdomsperiode har gitt mange gode praktiske og faglige råd til stor nytte under prosessen. Takker Anna Germundsson og Lone T Engerdahl ved Veterinærinstituttet for virusisolater i tillegg til tekniske og faglige råd. Takker Olav Hungnes og Remilyn Ramos-Ocao ved Folkehelseinstituttet (FHI) som har bidratt med viktige virusisolater i tillegg til nyttige primersekvenser. Takk til Jan Erik Berdal for muligheten til å ta del i hans doktorgradsarbeid samt hjelp til innsamling av prøvemateriale. Takk til Tom Eirik Mollnes og Pål Aukrust for god immunologisk ekspertise samt hjelp i planlegging av *in vitro* stimuleringsforsøket.

Retter en stor takk til avdelingen/seksjonene for muligheten til å gjennomføre denne masteroppgaven og muligheten til å fordype meg i et spennende fagfelt. Spesiell takk til min seksjonssjef Hege Smith Tunsjø for tilrettelegging av skrivearbeidet og for gjennomlesing/korrektur av mastergraden.

Ahus, mai 2012

May Tove Furuseth

Sammendrag

Tidlig i 2009 ble en ny variant H1N1 influensa A, influensa A(H1N1)pdm09, med sannsynlig svineopprinnelse oppdaget å smitte mellom mennesker. Etter det første utbruddet i Mexico by i april 2009 vurderte WHO (World Health Organization) denne influensa A varianten for å være en "alvorlig hendelse av betydning for internasjonal folkehelse". I mai 2009 ble sykdommen registrert i Norge. Denne varianten ble erklært til pandemivirus juni 2009 som den første influensapandemien i det 21. århundre.

Pandemisk influensavirus 2009 var en ny reassortant av subtype H1N1 og svært ulik H1N1 sesonginfluensaviruset, noe som ga lite immunitet i befolkningen. Til tross for dette ga influensa A(H1N1)pdm09 i de fleste tilfeller en mild luftveissykdom. Ved sesonginfluensa er det normalt høyest dødelighet hos eldre over 65 år, men pga pre-eksisterende immunitet var det få eldre som ble syke og døde av influensa A(H1N1)pdm09. Til tross for flest tilfeller av mild sykdom forekom det økende tilfeller av alvorlig sykdom hos yngre mennesker tidligere friske og uten underliggende sykdom. Disse pasientene utviklet alvorlig lungesykdom og respirasjonssvikt.

I dette studiet ønsket vi å se på virus og vertsegenskaper i tidlig fase av pandemien ved å inkludere et utvalg hospitaliserte pasienter med alvorlig influensa A(H1N1)pdm09 sykdom, både for å karakterisere vertsresponsen hos de alvorlig syke, samt studere mulige virusfaktorer av betydning for sykdomsbilde. Det ble samlet pasientprøver i løpet av høsten 2009 i samarbeid med avdeling for infeksjonsmedisin ved Akershus Universitets sykehus (Ahus) og Oslo Universitetssykehus Rikshospitalet (RH). Studiet er godkjent av regional komiteer for medisins og helsefaglig forskningsetikk (REK) og personvernombudet ved Ahus. Prøvemateriale inkluderte serum/plasma, cellulært RNA fra fullblod (PaxGene) og sekret fra nasopharynx (NX). Resultatene fra intensivstudien er publisert i egen artikkel (Berdal *et al.,*2011).

Våre funn viste at flere av de alvorlig syke pasientene hadde viremi. Noen av pasientene hadde en punktmutasjon i virusets HA funnet i blodet i forhold til virus funnet i øvre luftveier. Denne polymorfismen ga en endring i aminosyreposisjon 222 i HA fra asparginsyre (D) til glysin (G) eller aspargin (N). Disse pasientene hadde en veldig høy inflammasjonsrespons og vi ønsket derfor å studere *in vitro* om det er forskjell i direkte aktivering av blodceller mellom ulike varianter av viruset.

Fullblod fra friske givere i alderen 30-50 år, jevnt kjønnsfordelt ble stimulert med sesong influensa A/H1N1, influensa A(H1N1)pdm09 villtype 222Dpdm og mutert 222Gpdm for å se på immunresponsen. Fra det stimulerte materialet ble cellulært RNA isolert og undersøkt for uttrykk av relevante/utvalgte gener ved bruk av real-time-RT-PCR.

Virusvarianten 222Gpdm ga signifikante forskjeller i forhold til kontrollen for flere cytokiner og kjemokiner som er viktige for vertens immunrespons, spesielt inflammasomspesifikke cytokiner, og førte til nedregulering av CD4. IP-10 var signifikant oppregulert for cellene stimulert med 222Dpdm og sesonginfluensavirus i forhold til kontroll, men ikke for celler stimulert med 222Gpdm.

Den observerte responsen viste at 222Gpdm viruset hadde andre egenskaper i forhold til vertsrespons enn sesong influensavirus eller 222Dpdm variant, noe som kan forklare dens assosiasjon med de alvorligste kliniske tilfeller av influensa. Dette gir oss bedre forståelse for de underliggende mekanismene for alvorlig influensa sepsis under tidlige pandemifaser, samt betydningen av samspill mellom virus og vertsresponsen for patogenisitet.

Summary

In early 2009, a new variant H1N1 influenza, A (H1N1) pdm09, with probably swine origin discovered to be transmitted between humans. After the first outbreak in Mexico City in April 2009 the WHO (World Health Organization) consider this influenza A variant to be a "serious event of significance for international public health." In May 2009 the disease was registered in Norway. This variant was declared the pandemic virus in June 2009 as the first flu pandemic in the 21st century.

Pandemic influenza virus of 2009 was a new reassortant H1N1 subtype and different from H1N1 seasonal influenza virus, resulting in low immunity in the population. Despite this, the influenza A (H1N1) pdm09 in most cases lead to mild respiratory illness. The seasonal flu normally give raise to highest mortality in elderly over 65 years, but because of pre-existing immunity, few elderly people got ill and died of influenza A (H1N1) pdm09. Although most cases of mild illness occurred, but increasing cases of severe disease in previously healthy young people without underlying disease was observed. These patients developed severe lung disease and respiratory failure.

In this study, we wanted to look at the virus and host properties in the early stages of the pandemic by including a selection of hospitalized patients with severe influenza A(H1N1)pdm09 disease. We wanted to characterize the host respons in the severely ill patients, and study the possible viral factors important for illness. Patiant samples were collected in autumn 2009 in cooperation with the department for infectious diseases at Akershus University Hospital (Ahus) and Oslo University Hospital Rikshospitalet (RH). This work was approved by the Regional Ethics Committee (REK) and Data Protection Officer at Ahus.The testmaterial included serum/plasma, cellular RNA from whole blood (PaxGene) and secret from nasopharynx (NX). The results of intensive study is published in a separate article (Berdal *et al*.,2011).

Our findings showed that several of the seriously ill patients had viremia. Some of the patients had a point mutation in the virus hemagglutinin (HA) found in the blood in relation to viruses found in the upper respiratory tract. The polymorphism resulted in a change in amino acid position 222 in the HA from aspartic (D) to glycin (G) or aspargine (N). These patients had a very high inflammatory response and we therefore wanted to study in vitro whether there is a difference in the direct activation of blood cells between different variants of the virus. Whole blood from healthy donors aged 30-50 years, evenly distributed between genders were stimulated with seasonal influenza A/H1N1, influenza A

(H1N1) pdm09 wild-type 222Dpdm and mutant 222Gpdm to study the immuneresponse. From stimulated material cellular RNA was isolated and examined for expression of relevant / selected genes using real-time RT-PCR.
Virus with 222Gpdm gave significant differences compared to the control of several cytokines and chemokine that are important to the host's immune response, especially cytokines important for the inflammasom, leading to down-regulation of CD4. IP-10 was significantly up-regulated for the cells stimulated with 222Dpdm and seasonal influenza viruses in relation to control, but not for cells stimulated with 222Gpdm.

The observed response showed that the 222Gpdm virus had other characteristics in relation to the host response than seasonal influenza, or 222D variant, which may explain its association with the most severe clinical cases of influenza. This gives us a better understanding of the underlying mechanisms of severe sepsis during the influenza pandemic early stages, and the importance of interaction between virus and host response of patogenisitet.

Innhold

Sammendrag 2
Summary 4
Forkortelser 8

1. Teori 9
1.1 Influensavirus og naturlige reservoarer 9
1.2 Subtyper av influensavirus 10
1.3 Influensavirus struktur 11
1.4 Viral replikasjon 12
1.5 Aviært influensavirus 15
1.6 Influensavirus hos mennesker 16
1.6.1. Influensavirus evolusjon 17
1.6.1.1 Antigen drift 17
1.6.1.2 Antigen skift 17
1.6.2 Artsbarriere 17
1.6.3 Pandemier 19
1.6.3.1 Tidligere pandemier 19
1.6.3.2 Pandemi 2009 - "svineinfluensa" 21
1.6.3.3 Reseptorbindingssete på HA hos influensa A(H1N1)pdm09 24
1.7 Patogenese 26
1.7.1 Smittemåte 26
1.7.2 Symptomer influensa A(H1N1)pdm09 26
1.7.3 Vertens respons 27
1.8 Målet med studien 29

2. Materiale og metoder 30
2.1 Materiale intensivpasient studien 30
2.1.1 Pasientmateriale 30
2.1.2 Virus 31
2.2 Metoder intensivpasient studien 31
2.2.1 Undersøkelse av cellulært RNA (PAXgene Blood RNA Tube) fra pasientprøvene 31
2.2.1.1 RNA isolering 31
2.2.1.2 Kvalitet- og kvantitetsvurdering av isolert RNA 31
2.2.2 Analyser i annet laboratorium-mikromatrise 32
2.2.3 TaqMan real-time PCR (Gene Expression Assays) på utvalgte gener 32
2.2.3.1 cDNA syntese 33
2.2.3.2 Real-time PCR 33
2.3 Metoder intensivpasient studien: viruspåvisning i pasientenes sekret fra nasopharynx og serum/plasma prøver 34
2.3.1 Totalnukleinsyre isolering av sekret fra nasopharynx og serum/plasma fra pasientene til influensapåvisning. 34
2.3.2 Real-time ett-trinns RT PCR for påvisning av influensa A(H1N1) fra pasientprøver(sekret fra nasopharynx og plasma/serum) 34
2.3.2.1 Generell påvisning av influensa A virus 35
2.3.2.2 Påvisning av influensa A(H1N1)pdm09 35
2.3.3 Kvantitering av influensa A(H1N1)pdm09 36
2.3.3.1 Tillaging av influensa A standard materiale med kloning 36

2.3.3.2 Isolering av plasmid DNA 37
2.3.3.3 Tillaging av standardkurve 37
2.3.4 DNA sekvensering 38
2.3.4.1 Sekvensering av plasmid 38
2.3.4.2 Sekvensering av posisjon 222 i HA 39
2.3.4.2.1 cDNA syntese 39
2.3.4.2.2 Nested PCR 39
2.3.4.2.3 Agarose gelelektroforese 42
2.4 Materiale *in vitro* stimuleringsforsøket 43
2.4.1 Givere 43
2.4.2 Virus 44
2.4.3 Genene 45
2.5 Metoder stimuleringsforsøket 46
2.5.1 RNA isolering 46
2.5.2 Kvantitering av virusmengde i cellesupernatant før stimuleringsforsøket 46
2.5.2.1 cDNA syntese 47
2.5.2.2 Real-time PCR 47
2.5.2.3 Pilotstudiet 47
2.5.2.3.1 Viruskonsentrasjon og inkubasjonstider 47
2.5.2.3.2 Fullblod versus buffycoat 48
2.5.3 Analyse ved annen seksjon: differensialtelling 48
2.5.4 Analyse i annet labaratorium: H1 test 48

3. Resultater 49
3.1 Resultater intensivpasient studien 49
3.1.1 Genuttrykk 49
3.1.1.1 RNA-kvalitet av isolert cellulært RNA (PAXgene Blood RNA-rør) 49
3.1.1.2 Bekreftelse av mikromatrisefunn med TaqMan® real-time PCR 49
3.1.2 Påvisning og kvantitering av influensa A 50
3.1.2.1 Sekret fra nasopharynx fra de hospitaliserte pasienten 50
3.1.2.2 Plasmaprøver fra de hospitaliserte pasienten 51
3.1.3 Sekvensering av posisjon 222 i HA 52
3.1.3.1 Influensavirus A sekvens pasient 1 52
3.1.3.2 Influensavirus A sekvens pasient 2 53
3.1.3.3 Influensavirus A sekvens pasient 5 53
3.1.4 Oppsummering av virusresultater fra intensivpasient studien 54
3.3 Resultater stimuleringsforsøket 55
3.3.1 Pilotundersøkelse 55
3.3.1.1 Prøvers egnethet med ulike antikoagulans: EDTA versus Lepirudin 55
3.3.1.2 Viruskonsentrasjon og inkubasjonstider 56
3.3.1.3 Fullblod versus buffycoat 57
3.3.1.4 Konklusjon fra pilotundersøkelsen 57
3.3.2 Stimuleringsforsøk - hovedforsøket 57
3.3.2.1 Cellepopulasjonsfordeling i blodprøvene fra giverne 57
3.3.2.2 Måling av influensavirus A spesifikke antistoffer hos giverne ved HI test utført ved (Veterinærinstituttet) 58
3.3.2.3 Genekspresjon 58
4. Diskusjon 63
5. Konklusjon 70
6. Litteraturliste 71

Forkorteslser

Forkortelse:	Fulltekst:
aa	aminosyre, (aminoacid)
Ahus	Akershus Universitetssykehus
cDNA	komplementert DNA
CDC	Center for Disease Control and Prevention
DNA	deoksyribonukleinsyre
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EU	europeiske union
ESWI	European Scientific Working group on Influenza
HA	hemagglutinin
H1N1pdm09	pandemisk svineinfluensa 2009
IFN	interferon
IRF3	interferon regulerende faktor 3
IRF7	interferon regulerende faktor 7
LNA	locked nucleic acid
min	minutter
M2	M2 ione kanal protein
MIP	makrofag inflammatorisk protein
MMP-8	matrix metalloproteinase-8 (nøytrofil kollagenase)
MCP	monocytt kjemoattraktant protein
mRNA	messenger ribonucleic acid
M1	matriksprotein
NA	neuraminidase
NEP	nukleær eksport protein
NaOH	Natrium hydroksid
NLS	nukleære lokaliserings signaler
NP	nukleoprotein
NS	non-structurel protein/ikke struktur dannende protein
NK-celle	

Forkortelse:	Fulltekst:
PA	polymerase acid protein
pdm	pandemi
PB1	polymerase basic protein 1
PB2	polymerase basic protein 2
RT PCR	revers transcriptase polymerase chain reaction
RNP	ribonukleoprotein
FHI	Folkehelseinstituttet
REK	regional komiteer for medisins og helsefaglig forskningetikk
RH	Oslo Universitetssykehus Rikshospitalet
RIG-I	Retinoat gen I
Rpm	
rpm	revolutions per minute (omdreiningstall)
RNA	ribonucleic acid
SDS	sodium dodecyl sulfate
Tmvl	virus transport medium
TIMP	metallopeptidase inhibitor
TLR3	interferin regulerende faktor 3
TLR7	interferin regulerende faktor 7
WHO	verdens helseorganisasjon

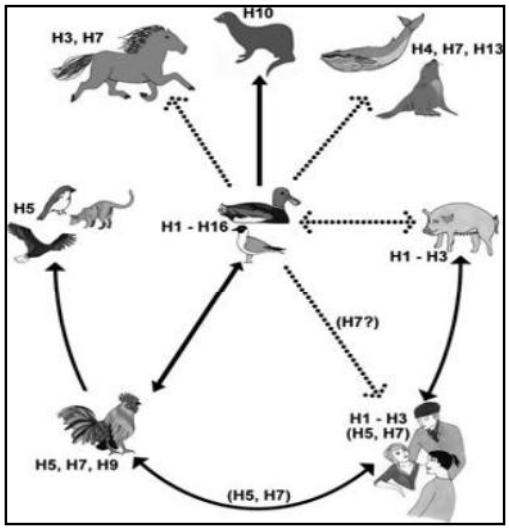
1. Teori

1.1 Influensavirus og naturlige reservoarer

Influensaviruset tilhører familien *Orthomyxoviridae* og har et segmentert genom, bestående av åtte negativ trådet RNA segmenter. Influensavirus deles inn i A-, B- og C- influensavirus ut i fra antigenforskjeller i matriksprotein (M1) og nukleoprotein (NP) (Cheung *et al*., 2007). Influensavirus A og B gir årlige utbrudd i vinterhalvåret hos mennesker og kan forårsake alvorlig sykdom. Influensavirus A finnes også i dyr og er av helsemessig betydning for både mennesker og dyr mens influensavirus B finnes hovedsakelig hos mennesker (Webster *et al.,* 1992).

Influensavirus A har sitt naturlige reservoar hos akvatiske fugler som *Anseriformes* (ender, gjess og svaner) og *Charadriiformes* (måker, terner og vadefugler) (Webster *et al.,* 1992). Hos sine naturlige reservoararter, formerer viruset seg i hovedsak i tarmen og skilles ut i store mengder i avføring og gir oftest få eller ingen symptomer. Viruset smittes gjennom inntak av feces-kontaminert overflatevann og spres av trekkfugler. Andre smittemåter forekommer også som transport av ubehandlet fjørfe, fjørfeprodukter, handel med fjørfe og ville fugler. I sitt naturlige reservoar, akvatiske fugler, gir influensavirus A oftest få eller ingen symptomer (Webster *et al.,* 1992).

Aviært influensavirus smitter regelmessig fra ville fugler til innlandsfugl eller fugler i dyrehold/fjørfe, men kan også smitte svin og mennesker. Denne kryssing av artsbarrieren er lettere til andre fugleslag enn til mennesker. Menneskers slimhinner er lite mottakelige for aviært influensavirus. En sjelden gang kan likevel mennesker bli smittet gjennom direkte eller indirekte kontakt med infiserte fuglers avføring eller luftveissekret (figur 1.1). Fra tid til annen er det påvist smitte fra svin til menneske, eller fra menneske til svin. Siden svin også er mottakelige for influensavirus fra fugl har de potensiale til å være en mulig mellomvert, et "blandekarr". Da kan virus fra fugl tilpasse seg pattedyrvert og utvikle evne til å smitte effektivt blant mennesker (Wenjun *et al*., 2009). Influensavirus A er også isolert fra andre dyrearter som hester, mink, kattedyr, sjøpattedyr i tillegg til et bredt spekter av tamme og ville fugler.



Figur 1.1. Habitat av influensavirus A. *Ville akvatiske fugler er naturlig reservoar for influensavirus A men det forekommer regelmessig smitte mellom arter. Det er påvist ulike subtyper i de forskjellige artene (illustrasjon laget av Rebecca Rönnmark og Eric Gisaeus (Wahlgren 2011).*

1. 2 Subtyper av influensavirus.

Influensavirus A klassifiseres i subtyper etter overflateproteinene hemagglutinin (HA) og neuraminidase (NA). Så langt er det beskrevet 16 ulike subtyper av HA (H1-H16) og 9 subtyper av NA (N1-N9) i fugler (Fouchier *et al* 2004). Sist påviste subtype H16 ble funnet hos hettemåker i sverige i 2005 (Fouchier *et al* 2005). Selv om hele seks millioner akvatiske trekkfugler krysser Alaska regionen hvert år viser fylogenetiske studier i hovedsak to fordelinger av de 16 HA subtypene, en euroasiatisk og en amerikansk fordeling (Webster *et al* 2011, Olsen *et al* 2006).

HA - og NA – proteinene kan kombineres på ulike måter og det finnes teoretisk 144 mulige kombinasjoner, men bare om lag 70 av disse har forekommet naturlig (Liu *et al*.,2009) (tabell 1.1). De øvrige segmentene i arvematerialet kan også byttes, denne utvekslingen av genmateriale kalles reassorting. Dette gir en teoretisk uendelig variasjon av nye virus med ulike egenskaper selv om cross-talk mellom disse segmentene og de kodede proteinene er avgjørende for om en slike reassorteringer faktisk finner sted

Tabell 1.1. NA- og HA-subtyper. *Fordeling av NA-subtyper i forhold til de 16 HA-subtypene. (Liu et al 2009).*

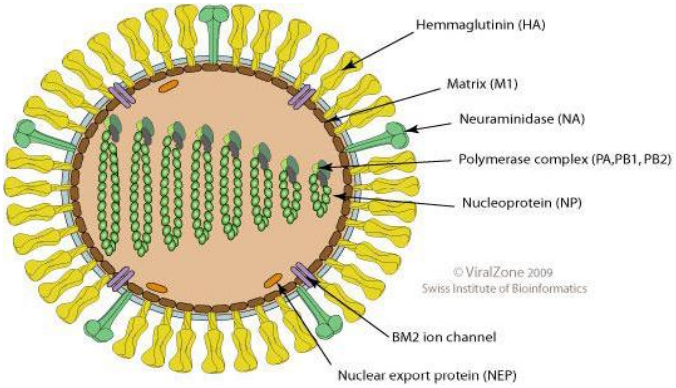
Table 1. NA-subtype distribution of 14328 influenza A viruses with HA sequences in GenBank*.

Subtypes	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	Unknown	Total
H1	***2162***	***148***	1	0	2	3	1	0	2	58	2377
H2	11	***99***	23	1	8	0	3	4	12	2	163
H3	17	***6658***	11	1	4	29	0	***231***	2	472	7425
H4	4	16	5	3	3	***69***	2	23	2	5	132
H5	***2103***	***204***	49	0	1	3	9	4	14	10	2397
H6	***148***	***123***	6	6	21	8	1	45	5	11	374
H7	***107***	***156***	***94***	4	1	0	***83***	3	3	15	466
H8	0	1	0	***11***	0	0	0	0	0	0	12
H9	10	***773***	3	0	4	3	0	1	0	6	800
H10	2	1	6	3	0	3	***38***	3	2	1	59
H11	3	10	6	1	0	2	0	2	***38***	3	65
H12	1	2	0	2	16	0	0	0	2	1	24
H13	0	4	0	0	0	9	0	1	1	0	15
H14	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	3
H15	0	1	0	0	0	0	0	1	4	0	6
H16	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	10

*The presumably predominant NA subtypes within each HA subtype were in bold and italics.
doi:10.1371/journal.pone.0005022.t001

1.3 Influensavirus struktur.

Influensavirus A genomet består av 8 enkelttrådede RNA segmenter som varierer i størrelse fra 890 til 2350 nukleotider og som koder for 11 proteiner (Webster *et al* 1992)



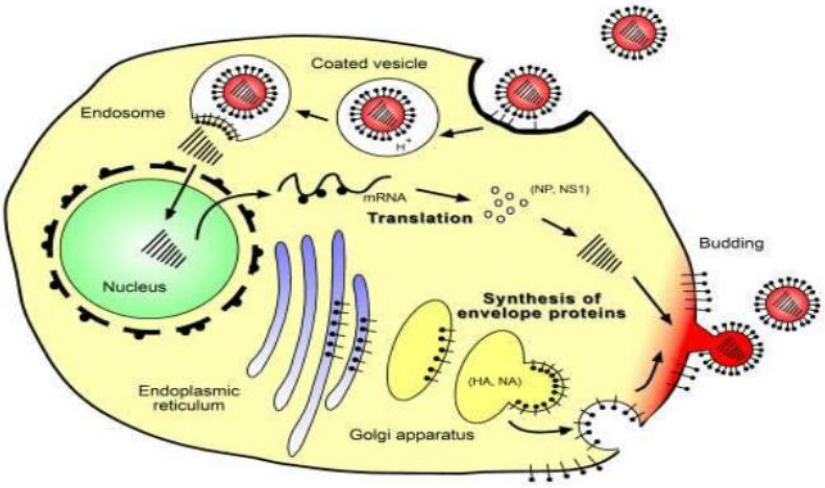
Figur 1. 2. Influensavirus A struktur. *I virusmembranen finnes tre proteiner, HA, NA og noen få M2 (ione-kanaler). Inne i viruset finnes de 8 enkelttrådede RNA segmentene bundet til ulike virusproteiner (ViralZone 2010)*

Disse proteinene er i tillegg til de to overflateproteinene HA og NA, tre polymeraseproteiner PB1, PB2 og PA, tre strukturproteiner NP, M1 og M2 og tre ikke-struktur relaterte proteiner, som er involvert i transport inn og ut av kjernen, NS1 og NS2, i tillegg til PB1-F2 som induserer apoptose og påvirker alveolære makrofager (Chen *et al.,*2004)(figur 1.2). Alle de 8 RNA segmentene koder for ett protein hver. I tillegg koder PB1 også for PB1-F2, matriks genet koder for M1 og M2 og det minste genet koder for NS1 og NS2 (NEP) ved hjelp av alternativ spleising (tabell 1.2).

Tabell 1.2. Influensavirus A struktur. *Influensavirus A består av åtte RNA segmenter som koder for 11 proteiner.*

RNA segment	Protein	Antall aa	Funksjon
1	Polymerase B2 protein (PB2)	759	cap bindene, endonuklease
2	Polymerase B1 protein (PB1 og PB1-F2)	757	RNA polymerase
3	Polymerase A protein (PA)	716	RNA polymerase
4	Hemagglutinin (HA)	550	membranprotein, reseptorbinding, membranfusjon
5	Nukleoprotein (NP)	498	del av RNP, import av RNA til kjernen
6	Neuraminidase (NA)	454	sialidase aktivitet, frigjøring av virus
7	Matriksprotein (M1 og M2)	258 og 97	struktur, RNA eksport fra kjernen, M2: ionekanal
8	Non-structural protein (NS1 og NEP)	230 og 121	IFN antagonist, nukleær eksport faktor

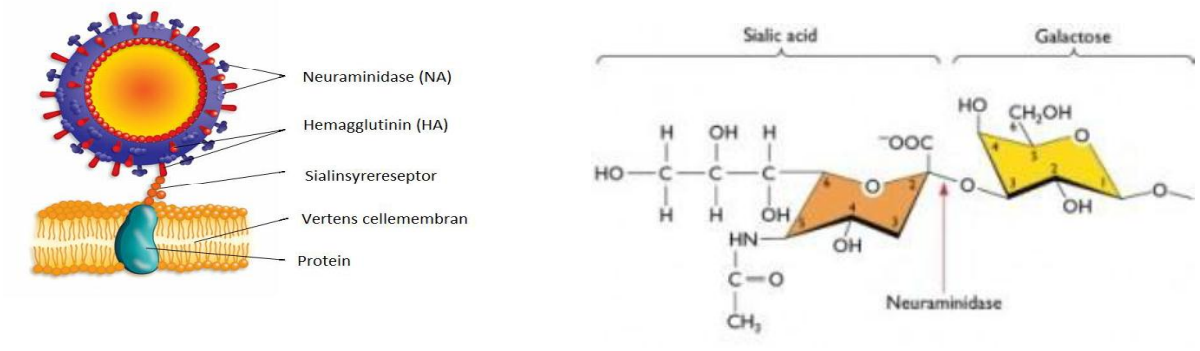
1.4 Viral replikasjon.



Figur 1. 3. Replikasjon av influensavirus A. *HA binder spesifikke sialinsyrereseptorer på vertscellens overflate, alfa-(2,3) eller alfa-(2,6) sialinsyre-galaktose reseptorer. Dette induserer en reseptor-mediert endocytose som fører viruset inn i cellen. Det virale RNA frigjøres til cytoplasma ved en fusjon mellom virusets ytre membran og den endosomale membranen. Denne fusjonen er pH avhengig. Viralt RNA fraktes inn i cellekjernen hvor det syntetiseres nye viruspartikler (Modifisert fra Cox & Kawaoka 1997)*

Viruset replikerer i kjernen i smittede celler og utnytter vertscellens maskineri til å syntetisere nye viruspartikler (figur 1.3). For å komme inn i celler binder HA seg til en sialinsyrereseptorer på vertscellen. Sialinsyrereseptoren består av ett protein, sialinsyre og en

galaktose (figur 1.4). Bindingen av HA til sialinsyrereseptor medierer en endocytose som gjør at viruset kommer inn i vertscellen.

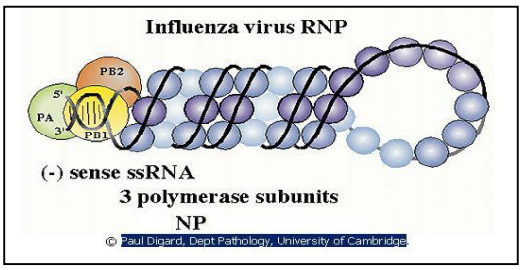


Figur 1.4. Binding av HA til sialinsyrereseptor. *Virusets HA protein binder seg til vertens cellemembran via en sialinsyrereseptor. Denne reseptoren består av sialinsyre og galaktose, der bindingen mellom disse er NA kløyvingssete. (Figur til venstre modifisert og hentet fra World Wide Web:* http://mattison0922.wordpress.com*, og figur høyre fra http://virology.ws)*

HA syntetiseres som et ”precursor” protein, HA0,som kløyves i to polypeptide av vertens proteaser til HA1 - og HA2, der HA1 binder til reseptor, og inneholder de fleste epitoper som vertens antistoffer er rettet mot, mens HA2 inneholder fusjonspeptidet, av betydning for virusets inngang i cellene. Denne kløyvingen foregår normalt ved hjelp av ekstracellulære proteaser, av type trypsin eller trypsin-liknende proteaser.

Ved nøytral pH danner HA en homotrimer bestående av av 3 HA proteiner som hver består av to subenheter HA1(øvre NH_2del) og HA2 (den transmebrane COOH delen). Disse er bundet sammen av disulfidbinding. Fusjon av virusets membran med cellemembran skjer i endosomet, som følge av en pH-avhengig konformasjonsforandring, nødvendig for frigjøing av fusjonspeptidet i HA2. Det er virusets membranproteinet M2 som fungerer som en ionekanal som åpner for gjennomstrømning av H+ ioner slik at miljøet i endosomet blir surt.

Strukturendringen i endosomet åpner en pore som frigjør viralt RNA til cytoplasma. Viralt RNA (vRNA) er bundet til fire virusproteiner: nukleoprotein (NP), polymeraseproteiner (PB1, PB2 og PA), der NP er hovedproteinet. Disse danner viralt ribonukleoprotein kompleks (vRNPs) som inneholder virusets arvestoffet (figur 1.5). (Huang *et al* 1990).



Figur 1. 5. Viralt ribonukleoprotein kompleks. *vRNA er bundet til fire virusproteiner NP, PB1, PB2 og PA som danner et viralt ribonukleoprotein kompleks, vRNP. (Figur hentet fra World Wide Web: http://www.microbiologybytes.com)*

Virusets polymeraseproteiner er aktive inne i vertens cellekjerne og transport av disse inn til cellekjernen er avgjørende for transkripsjon og replikasjon av viruset. Import av disse vRNPs inn til kjernen er avhengig av bestemte nukleotidsekvenser, nukleære lokaliseringssignaler (NLS) og vertens protein, importin. Inne i kjernen transkriberes mRNA til virale proteiner og vRNA til nye viruspartikler og en prosess som foregår i flere trinn. Polymerasen PB2 binder seg til vertens mRNA 5'-ende som består av 7-methylguanosine (m7G). I neste trinn kløyver viruspolymerasen PB1 m7G/PB2 komplekset via sin endonukleaseaktivitet. Komplekset fungerer som en primer for polymerase PB1 og forlenges med 11-15 nukleotider som er komplementære til den konserverte 3'-enden av vRNA. (Ishihamat *et al.,* 1986). Virus polymerase PB1 og PA fullfører så syntesen av den komplementære RNAtråden, som er en positiv RNAtråd (messenger sense), som enten eksporteres til cytoplasma som mRNA for syntese av virale proteiner eller som forblir i cellekjernen som templat for syntese av det minustrådede genomisk RNAet. Det antas at mengden NP påvirker hvorvidt det produseres mRNA eller cRNA. Sent i infeksjonen er det mye NP, mRNA syntesen stopper opp mens cRNA syntesen, som er avgjørende for tillagging av store mengder virale genomer, fortsetter. Influensavirus benytter altså maskineriet i cellen til å lage tusenvis av kopier av seg selv som igjen bryter ut og infiserer andre celler.

Influensavirus membranproteinet NA frigjør nye viruspartikler ved å bryte ned sialinsyreseptoren (figur 1.4). Dannelse av nye frie viruspartikler er avhengig av en balanse mellom de to funksjonene reseptorbinding (ved HA proteinet) og reseptornedbryting (ved NA proteinet). Styrken av NAs enzymatiske aktivitet må derfor være tilpasset affiniteten av HA proteinet til cellens reseptor.

1.5 Aviært influensavirus.

Aviært influensavirus hos ville fugler er i hovedsak lite sykdomsfremkallende men enkelte lavpatogene aviære influensavirus av subtypene H5 og H7 kan mutere til høypatogent aviært influensavirus. Mutasjonen gir en endring i det proteolytiske kløyvingssete hos HA som er avgjørende for den høypatogene fenotypen. Kløyvingssetet hos lavpatogent aviært influensavirus består av en bestemt rekke aminosyrer (RETR) som kløyves av proteaser lokalisert hos fugler og pattedyr i luftveiene og tarmkanalen (trypsin lignende proteaser). Kløyvingssete hos høypatogent aviært influensavirus har flere basiske aminosyrer etter hverandre, såkalt polybasisk kløyvingssete (RERRRKR) som kløyves av proteaser i flere organer og av intracellulære proteaser (furin-lignende proteaser,som er lokalisert i cellenes Golgi apparat). Dette gjør at viruset lett kan smitte mange andre organer hos den infiserte verten, og hos fjørfe smitter høypatogent influensavirus spesielt endotelceller, og forårsaker hemorragisk død. Et skifte fra lavpatogent til høypatogent aviært influensavirus forårsaker dermed alvorlig sykelighet og dødelighet (Horimoto *et al.,* 2005). Slike spontane utbrudd av høypatogent influensavirus har skjedd over 50 ganger siden 1950. Denne endringen oppstår som en spontan mutasjon, ofte etter at viruset er overført fra villfugl til fjørfe, og har fått sirkulere i fjørfebesetning over lengre tid. Slike spontane utbrudd av høypatogent influensavirus har skjedd ved flere anledninger uavhengig av hverandre og gitt utbruddstilfeller med H5 eller H7. Funn av disse subtypene i fjørfe er meldepliktig for EU, også de lavpatogene ettersom de kan mutere spontant til høypatogene varianter.

I 1996 oppsto det i Sør-Kina en høypatogen variant av H5N1, som senere har gitt opphav til et stor epizootisk utbrudd blant fjørfe og villfugler i flere verdensdeler. Frem til 1997 trodde man ikke at influensavirus fra fugl kunne smittes lett rett over til mennesker, men i Hong Kong dette året ble det påvist et utbrudd av H5N1 hvor seks av 18 smittede mennesker døde. Utbruddet oppstod i en kyllingfarm og på kyllingmarkedet i Hong Kong. Dette var det første bekreftede tilfelle av smitte av influensa til menneske direkte fra fugl (høns) (Claas *et al.,*1998). Høypatogent aviært influensavirus med subtype H5N1 dukket opp igjen i 2002 hos vadefugler i to parker i Hong Kong og ble også påvist i andre ville fugler. Flere tilfeller ble oppdaget i 2003 og dette har hatt store konsekvenser for fjørfeindustrien i Sør-øst Asia siden 2004. Viruset ble isolert i 2005 under et utbrudd hos trekkfugler i Qinghai-sjøen i Kina hvor 60 000 ville fugler ble funnet døde. Senere har viruset dukket opp i Asia, Europa og Midt-Østen og i flere afrikanske land (Chen *et al.,* 2005). Det ser ut til at viruset så langt ikke har utviklet evnen til å smitte lett mellom mennesker, men nye tilfeller rapporteres stadig, spesielt

fra Egypt, Vietnam, Cambodia og Indonesia. I disse landene sirkulerer ulike varianter av H5N1, og viruset muterer veldig fort, slikt at WHO (verdens helseorganisasjon) har i beredskap ulike stammer for utvikling av vaksine ved eventuell pandemi med dette viruset (WHO). Etter det første påviste tilfellet av høypatogent aviært influensavirus med subtype H5N1 hos mennesker i 1997, er det påvist smitte til over 500 mennesker med en dødelighet på over 60%, de fleste av disse tilfellene er assosiert med utbrudd av høypatogent influensavirus i fjørfe (Fouchier, European Scientific Working group on Influenza (ESWI), 2011).

Forsøk har vist at viruset kan mutere slik at det smitter mellom pattedyr. Et forskerteam i Nederland har klart å lage en variant av A(H5N1) med kun totalt fem mutasjoner i HA og PB2. Det muterte viruset ga luftbåren smitte blant dyrene og var svært dødelig (Fouchier, ESWI 2011). Det statlige rådet for biologisk trygghet i USA anbefaler at fremgangsmåte og resultater ikke publiseres pga frykt for biologisk terror. Per dags dato holder Science igjen publiseringen av studiet.

På grunn av disse dødelige variantene, og siden influensavirus A fra fugl har gitt opphav til pandemier hos mennesker, er overvåking av influensavirus hos fugl svært viktig. Høypatogent influensavirus har så langt ikke vært påvist hos ville fugler eller fjørfe i Norge. Kun ett tilfelle av lavpatogent influensavirus med subtype H7 har blitt påvist hos fjørfe, i en hobbybesetning i Østfold i 2009 (Tønnessen *et al*., 2011). Derimot er det påvist mange ulike influensa subtyper hos villfugl i forbindelse med overvåking.

1.6 Influensavirus hos mennesker.

Influensavirus smitte hos mennesker opptrer enten som pandemi, epidemi/sesonginfluensa eller zoonose. Ved en pandemi introduseres en ny influensavirus A type hos mennesker. Ved en epidemi er influensavirus A pandemitypen adaptert og sirkulerer årlig. Ved en zoonose har influensavirus A smittet direkte fra dyr til mennesker ved direkte kontakt men uten at det gir videre spredning blant mennesker (FHI).
Bare et begrenset antall HA (H1, H2 og H3) og NA subtyper (N1 og N2) har gitt opphav til store verdensomspennende epidemier hos mennesker, som senere har gitt de årlige sesonginfluensa utbruddene. Subtypene H5, H7 og H9 er observert overført zoonotisk fra fugl til menneske uten effektiv menneske til menneske smitte.

Siden 1977 har subtypene H3N2 og H1N1 sirkulert og gitt sesonginfluensa A hos mennesker i vinterhalvåret i tempererte strøk.

1.6.1 Influensavirus evolusjon.

1.6.1.1 Antigen drift.

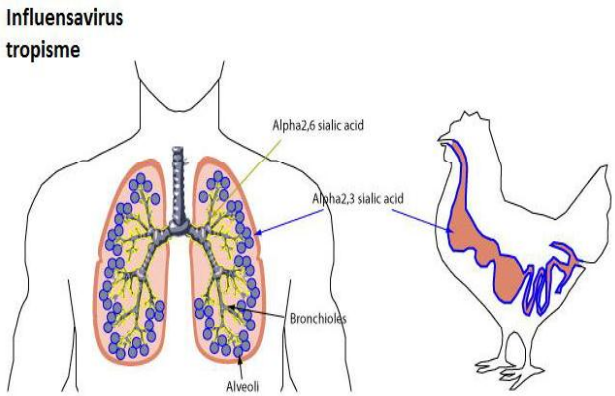
Influensavirus har en høy mutasjonsfrekvens siden RNA polymerasen mangler korrekturlesing (proofreading) ved replikasjon (Webster *et al.*, 1992). Antigen drift er evolusjonær utvikling som gir kontinuerlige endringer i HA eller NA som et resultat av seleksjonspress fra vertens immunsystem, men ikke mer enn at det finnes immunitet i verten. Denne variasjonen er tilstrekkelig til å gi gjentatt infeksjon med samme subtype og er årsak til den årlige sesonginfluensaen. På grunn av de stadige endringene må de stammene som inngår i sesong influensavaksine oppdateres jevnlig, for å gi tilstrekkelig beskyttelse.

1.6.1.2 Antigen skift.

Introduksjon av en ny HA subtype i befolkningen kalles antigen skift og det finnes da liten eller ingen immunitet hos verten. Dette kan skje enten ved at et virus i sin helhet smitter direkte hos mennesker fra sitt reservoardyr, eller at kun et begrenset antall segmenter, inkludert HA segmentet, inngår i et nytt virus ved hjelp av reassortering mellom et menneskeadaptert sesonginfluensavirus, og et dyrevirus. Influensavirusets segmenterte arvemateriale gir økt mulighet for reassorter inger av segmentene. Mange av disse influensavirus-varianter blir ikke replikasjonsdyktige men av og til oppstår en kombinasjon som kan ha evolusjonære fordeler. Når en helt ny HA-subtype introduseres og etableres i menneskepopulasjon, gir det opphav til pandemi, det vil si verdensomspennende epidemi.

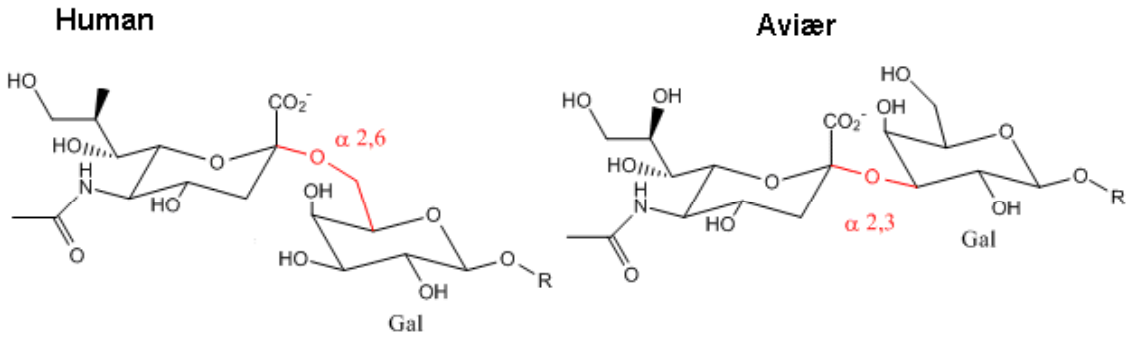
1.6.2 Artsbarriere.

Til tross for store mengder ulike influensavirus som sirkulerer hos dyr og som mennesker har tett kontakt med, er det begrenset smitte til mennesker fra dyr. I tillegg, selv om enkelte HA subtyper (H1 og H3) sirkulerer både hos fugl, svin og mennesker, er disse virusene godt adaptert til sine respektive verter. Selv om viruset har fugleopprinnelse i utgangspunktet smitter det ikke lett frem og tilbake mellom disse vertene. Dette tyder på at verts faktorer begrenser virusets evne til å infisere nye arter (Riel *et al.*,2006).



Figur 1.6. Influensavirus tropisme. *Epitelceller i luftrøret (trachea), bronkiene og alveolene uttrykker i hovedsak alfa-(2,6) sialinsyre-galaktose reseptorer mens alveolen også uttrykker alfa-(2,3) (Riel et al.,2006).*

Replikasjon av influensavirus er begrenset til luftveiene hos mennesker, og for å kunne spre seg effektivt blant mennesker må viruset kunne replikerer og skilles ut i store mengder i øvre luftveier, noe som er knyttet til reserptor gjennkjennelse av HA til riktig målcelle (figur 1.10). Hos humane adapterte influensavirus bindes HA til alfa-(2,6) sialinsyre-galaktose reseptorer som finnes i stor omfang i øvre luftveisepitel mens aviært influensavirus foretrekker alfa -(2,3) sialinsyre-galaktose reseptorer. Alfa-(2,3) sialinsyre-galaktose reseptorer finnes i tarmepitelet hos fugler. Hos mennesker finnes det også celler i luftveiene med alfa-(2,3) sialinsyre-galaktose reseptorer, men disse er lokalisert i nedre luftveier (figur 1.6). Hos svin finnes begge typer reseptorer i øvre luftveier og svin er derfor en mulig mellomvert for reassortering av menneske sesong- og aviært influensavirus (Riel *et al*.,2006).



Figur 1.7. Bindingssete for HA til målcellen. *Hos humane adapterte influensavirus bindes HA alfa-(2,6) sialinsyre-galaktose reseptorer (venstre) mens HA i aviært influensavirus binder i hovedsak alfa-(2,3) sialinsyre-galaktose reseptorer.*

Reseptor affinitet alene gir ingen vellykket infeksjon eller replikasjon hos verten. Temperatur er også en viktig faktor for at viruset skal kunne krysse en artsbarriere. Influensavirus A

replikerer hos sine naturlige verter ved 40-42°C. Influensavirus som krysser artsbarrieren må kunne replikere ved lavere temperaturer som 39ºC hos svin eller 37°C hos mennesker (eller helt ned til 32°C som i øvre luftveier hos mennesker). Ulike mutasjoner har vist seg å ha betydning for kryssing og replikasjon i annen vert. K627 residuen i PB2 proteinet er avgjørende for infeksjon hos mennesker. Virus med K627 kan vokse ved 33ºC og replikerer effektivt i de øvre luftveier hos mus, noe som indikerer at dette også er mulig hos mennesker. K627 ble også funnet i virus fra et fatalt tilfelle av H7N7 i Nederland i 2003, samt ved flere aledninger i virus fra mennesker som har dødd av H5N1 smitte.

Ulike importiner er avgjørende for om polymerasene kommer inn i vertens cellekjerne. Aviært influensavirus bruker andre importiner til dette enn menneske-influensavirus, noe som er av betydning for artsbariæren (Gabriel *et al*, 2008).

Viruset isolert fra Qinghai sjøen hos villfugl i Kina hadde også denne mutasjonen, og den har holdt seg i etterkommende virus som har gitt opphav til smitte hos fugl i Europa og Afrika. D701N mutasjon i PB2 har også vist seg å ha betydning for overføring mellom fugl og menneske.

1.6.3 Pandemier

1.6.3.1 Tidligere pandemier

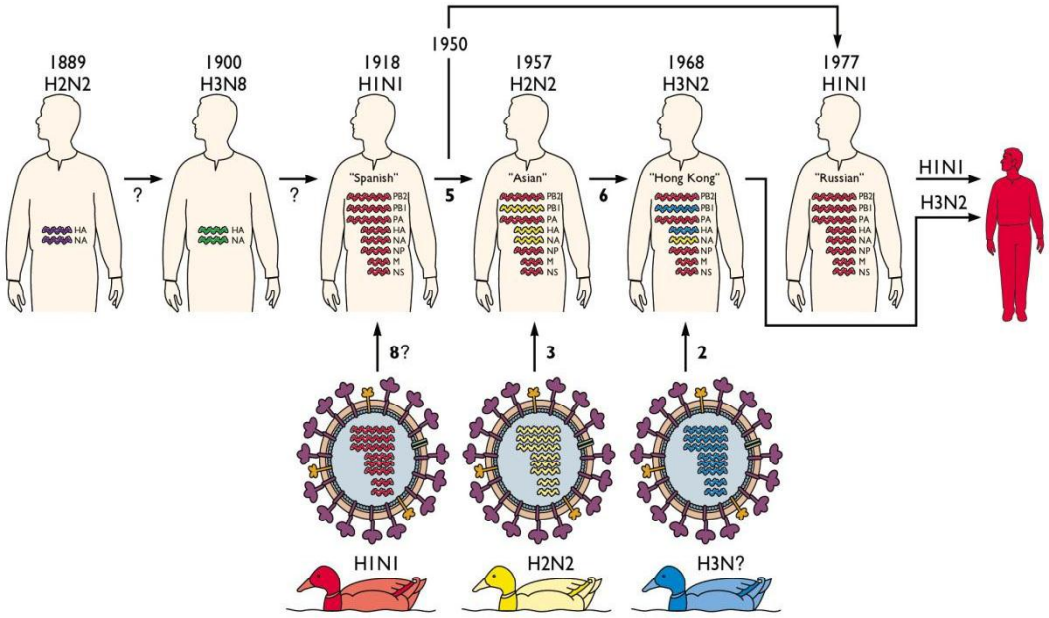
Hos mennesker har H1N1, H2N2 og H3N2 subtypene gitt opphav til pandemier i det 20 århundre. Pandemier er sjeldne, og det går ofte mellom 10 til 40 år mellom to slike store hendelser. I det 20 århundre har man hatt 3 pandemier, først Spanskesyken (1918-20) som er mest kjent og rammet flest mennesker, deretter Asiasyken (1957-58) og Hong Kong-syken (1968) (Horimoto *et al*., 2005). I tillegg gjennoppstod H1N1 viruset som sirkulerte på 50-tallet hos mennesker i 1977. Antagelig skyldes dette forsøk med H1N1 enten i laboratorium eller i felt (vaksineforsøk) i Asia. Denne epidemien ble kalt Russerinfluensaen (1977) (tabell 1.3).

Tabell 1.3. Tidligere pandemier på 1900-tallet. *Pandemier "presser ut" subtype som sirkulert i forkant og muterer seg frem til ny sesonginfluensa etter en tid.*

Pandemier			
Årstall	**Kallenavn/subtype**	**Kilde**	**Kommentarer**
1918	«Spanskesyken» H1N1	Fugl, trolig ikke reassortert med humant influensavirus. H1N1.	Pandemi med 20-40 mill. døde i verden
1957	«Asiasyken» H2N2	Reassortering mellom H1N1 og H2N2 fra fugl. H2N2	Pandemi. H1N1 forsvinner
1968	«Hong Kong-syken» H3N2	Reassortering mellom H2N2 og H3Nx fra fugl. H3N2	Pandemi. H2N2 forsvinner
1977	«Russerinfluensaen» H1N1	Ukjent. Først oppdaget i Kina. Nært beslektet med human H1N1 fra 1950-årene	Godartet pandemi, initialt affisert den personer født etter 1950. H1N1 har sirkulert sammen med H3N2 hos menneske siden 1977

I de første fasene i en pandemi tilpasser viruset seg raskt sin nye vert, og gir etter hvert de sesonginfluensaepidemiene som kommer hvert år. Hong Kong pandemien i 1968 med H3N2 influensavirus erstattet 1957 pandemistamme H2N2, mens denne hadde erstattet 1918 H1N1 viruset da den kom i 1957.

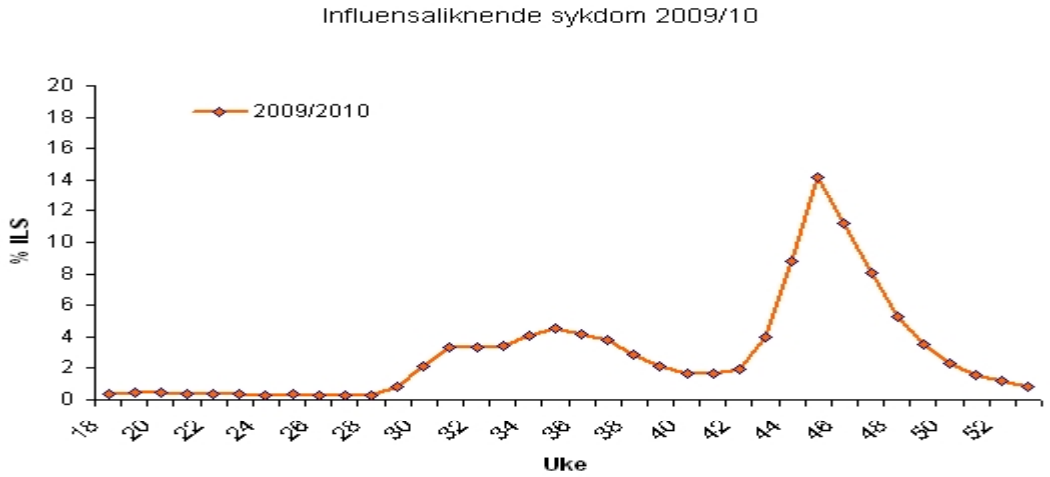
I 1977 gjenoppsto 1956 sesonginfluensa H1N1 virus, men denne ga ingen reell pandemi siden viruset var identisk med virus som hadde sirkulert 20 år før hos mennesker, slik at en stor del av befolkningen allerede hadde immunitet mot denne varianten (Horimoto *et al*., 2005). H1N1 1977 erstattet derfor ikke H3N2 viruset hos mennesker, men har frem til 2009 sirkulert sammen med H3N2, og disse har gitt de årlige sesonginfluensa A utbruddene i den perioden.



Figur 1.8. **Pandemier i det 20 århundre.** *H1N1, H2N2 og H3N2 subtypene har gitt opphav til pandemier I det 20 århundre, Spanskesyken (1918-20), Asiasyken (1957-58) og Hong Kong-syken (1968). (Webster and Wright, 2001).*

1.6.3.2 Pandemi 2009 - ”svineinfluensa”

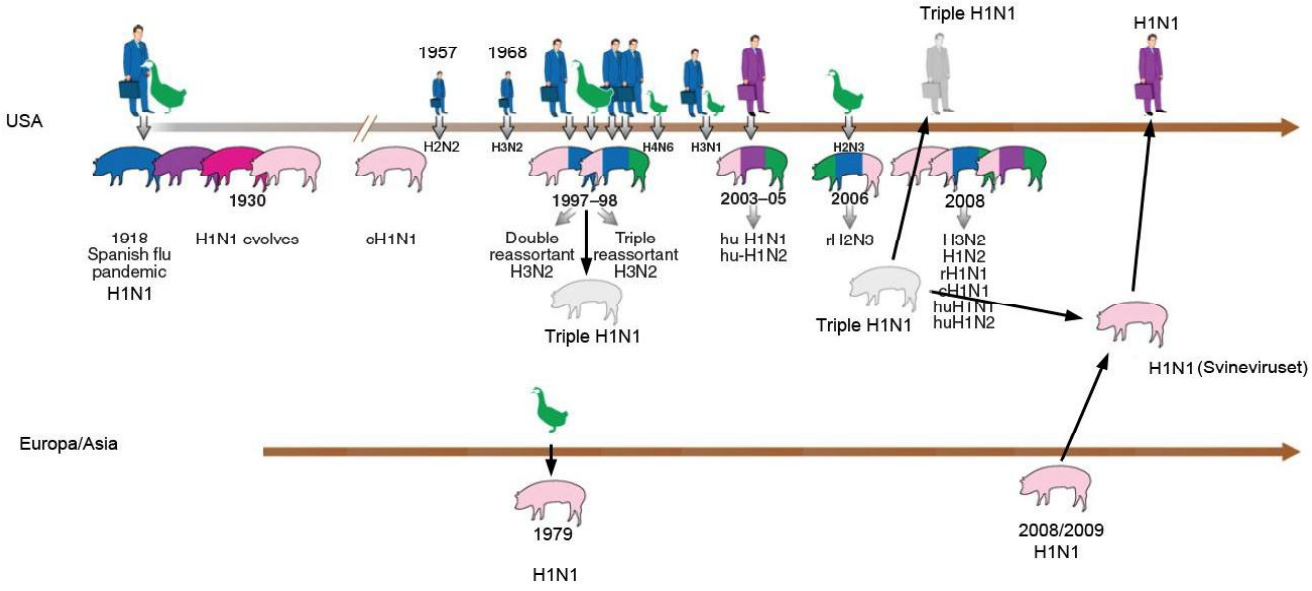
I april 2009 ble det første tilfellet av influensavirus A hos mennesker med sannsynlig svineopprinnelse rapportert i Mexico. I mai 2009 ble de første to tilfellene av influensa A(H1N1)pdm09 sykdom registrert i Norge. I Norge ble det i ukene 44 til 50 fra legekontorene registre flest tilfeller av diagnosen ”influensaliknende sykdom” (FHI) (figur 1.9).



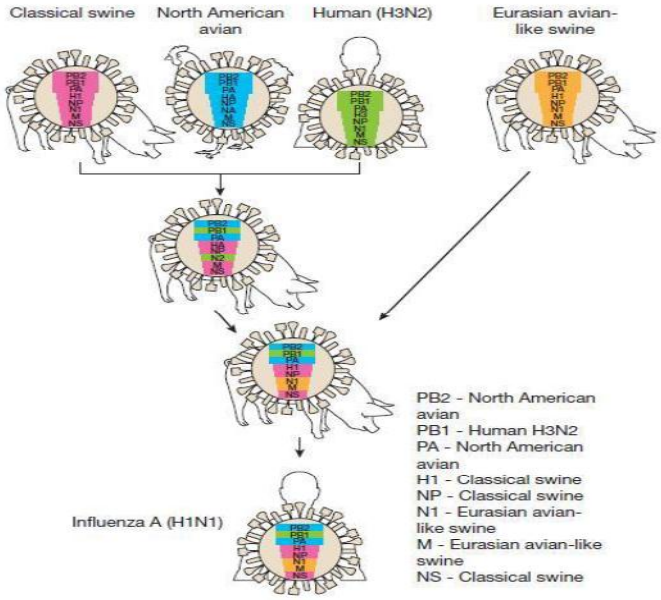
Figur 1.9. Influensaliknende sykdom (ILS) i Norge. *Grafen viser andel (%) av alle legekonsultasjoner per. uke med diagnosen ”influensaliknende sykdom” (fhi.no).*

Det viste seg at influensa A(H1N1)pdm09 var et nytt reassortert virus med en komplekssammensetning av gensegmenter fra flere arter. Det har vært noe begrenset overvåking av influensavirus i svin generelt, da svineinfluensa ikke er meldepliktig sykdom som skal rapporteres til OIE (verdens dyrehelseorganisasjon), noe som har gitt utfordringer i å kartlegge pandemiens opprinnelse.

Hos svin dominerer to subtyper av influensavirus, H3 og H1. Det første svineinfluensaviruset ble isolert i 1930 (Shope *et al*.,1931). H1N1 ble introdusert i 1918, samtidig med Spanskesyken, og viruset har adaptert seg og sirkulert siden i Amerika, såkalt klassisk H1N1 svineinfluensavirus (Noble *et al*, 1993). Klassisk H1N1 svineinfluensa ble introdusert til Italia en gang før 1976. Videre ble det i 1979 introdusert et nytt aviært H1N1 influensavirus til klassisk svineinfluensavirus i Europa med stor suksess (Van Reeth *et al*., 2007). Dette aviært-liknende svineinfluensaviruset reassorterte videre med humant HA og NA og begge subtypene har sirkulert siden 1979. Klassisk svin forsvant fra Europa (figur 1.10). I Eurasia ble en ny H1N1 variant introdusert fra fugl til svin på 70-tallet, og denne nye varianten overtok deretter i Europa (”Eurasian Avian-like” svine H1N1 influensviruset). I 1998 ble det i USA oppdaget en trippel reassortant mellom klassisk svineinfluensaviruset, fugleinfluensavirus (segmentene PB2 og PA), og menneske influensavirus (PB1 segmentet med opprinnelse fra H3N2 menneske virus). Viruset som ga opphav til pandemien var en videre reassortant med utgangspunkt i 1998 trippelreassortantviruset, ved at to tilleggssegmenter (M og NA) fra Eurasia Avian-like svine influensaviruset (figur 1.11). Siden viruset har PB2 fra nylig fugle opprinnelse, har ikke viruset K627, men det replikerer likevel veldig effektivt hos pattedyr.



Figur 1.10. **Evolusjon av H1 segmentet**. *H1 segmenten antas å ha blitt introdusert til svin i forbindelse med 1918 pandemien. I motsetning til H1 i human populasjon fra 1918 har H1 i svin holdt seg veldig stabil. H1 i human populasjon har gjennom antigen drift i lengre tid endret seg vesentlig fra H1 i svinepopulasjonen (Garten et al., 2009).*



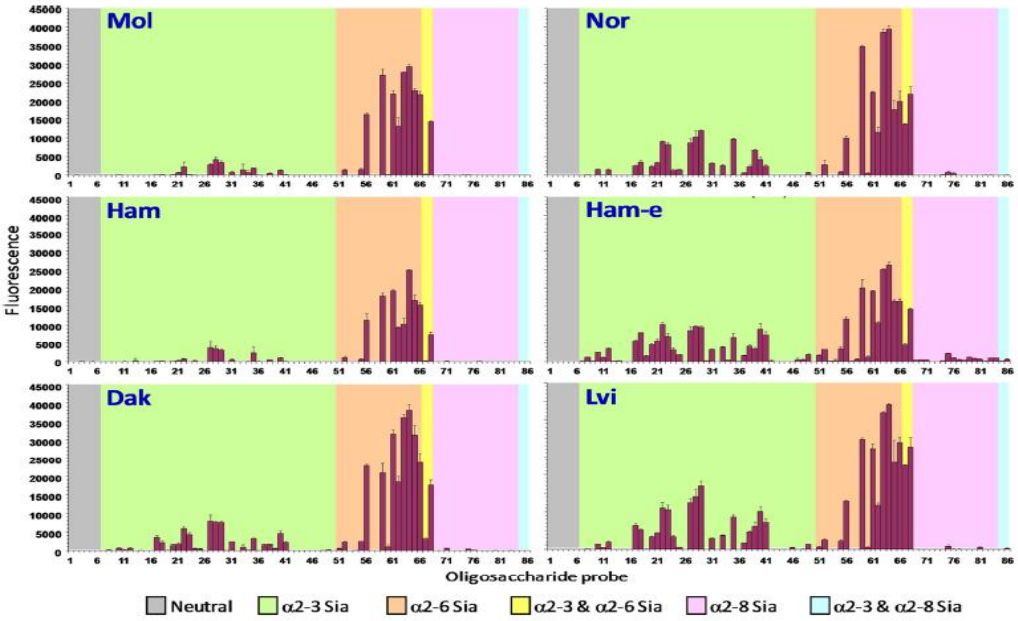
Figur 1.11. Den komplekse sammensetningen av Influensa A(H1N1)pdm09. *Influensa* ***A(H1N1)pdm09 har NA og M gensegmentene fra den Euroasiatiske svineavstamningen,*** *oppdaget i 1979 i Europa som en nyintrodusert variant fra fugl til svin. De resterende segmentene stammer fra den første trippelreassortanten i den Nord Amerikanske svinepopulasjonen. HA, NP og NS gensegmentene har sin opprinnelse fra klassisk svin avstamning hvor man antar at disse segmenten har sirkulert siden 1918. PB2 og PA gensegmenten er fra Nord Amerikansk influensavirus fra fugl. Virus med denne avstamningen ble introdusert til svin i Nord Amerika rundt 1998 (Garten et al, 2009). PB1 segmentet ble introdusert til svin fra menneske (H3N2) da den Nord Amerikans trippelreassortant i svin oppstod (Neumann et al., 2009).*

Viruset har antageligvis sirkulert hos svin en periode før det ble påvist hos mennesker. HA segmentet inneholder flere aminosyrer typiske for svineinfluensa virus og antas å ha svine-opprinnelse. Når viruset nå replikerer effektivt hos mennesker, kan det forventes at det muterer bort fra svine-spesifikke aminosyrer. I tillegg er det en mulighet for at viruset vil kunne reassortere med sirkulerende sesonginfluensavirus og få endrede replikasjons egenskaper. Sesongen 2011/2012, har influensa A(H1N1)pdm09 har sirkulert sammen med sesonginfluensa A(H3N2)-virus (www.fhi.no). Det ser dermed ut til at 2009 pandemiviruset ikke har erstattet H3N2 viruset, men at disse to nå kosirkulerer. Siden H1N1 ikke var en reell HA skifte (det var en H1N1 virus fra før hos mennesker), er det snakk om et såkalt pseudoskift.

1.6.3.3 Reseptorbindingssete på HA hos influensa A(H1N1)pdm09

Det reseptorbindende sete på HA er helt avgjørende for binding til sialinsyre reseptor og til videre formering/spredning av viruset. Studier har vist at influensa A(H1N1)pmd09, siden den hadde svineopprinnelse, hadde høyere affinitet for alfa-(2,6) sialinsyre-galaktose reseptorer enn alfa-(2,3) sialinsyre-galaktose reseptorer, og dermed kunne infisere celler både i øvre og nedre luftveier.

I forbindelse med alvorlige influensa sykdomstilfeller, ble det påvist en mutasjon i reseptorbindingssete i HA i influensaviruset A(H1N1)pdm09. Denne endrede reseptorspesifisiteten er assosiert med en aminosyre substitusjon i posisjon 222 i HA fra asparginsyre (D) til glysin (G) eller aspargin (N). Denne mutasjonen har i studier vist vesentlig høyere affinitet til alfa-(2,3) sialinsyre-galaktose reseptorer. Dette kan bety at viruset har kunnet infisere celler dypere i lungene, mens ikke muterte varianter vanligvis bindes til alfa-(2,6) sialinsyre-galaktose reseptorer i epitelceller funnet i nese, hals og øvre luftveier (Liu *et al.,*2009) (figur 1.12 og tabell 1.4). Aminosyreposisjon 222 i det reseptorbindende setet på HA kan ha en mulig innvirkning på bindingsspesifisiteten og dermed også celletropismen til viruset.



Figur 1.12. Karbohydrat mikromatrise analyse av H1N1pdm09. Bildet viser resultater av affinitet til glykanprober med ulike sialinsyre bindinger for virus med 222D (virusisolatene Mol og Ham), 222E (virus isolat Dak) og 222G (virusisolatene Nor, Lvi og Ham-e) på karbohydrat mikromatrise (Liu *et al*, 2010)

Tabell 1.4. Klinisk utfall og virusets aminosyre i posisjon 222 på henagglutininet (HA1), Norge, Mai 2009 til Januar 2010 (n=266). a) sykdommens alvorlighetsgrad basert på pasient informasjon, inndelt i kategorier. b) prosentvis genotype innenfor hver kategorie er oppgitt med antall pasienter i parentes. (Kilander *et al.*2009)

	Clinical outcome[a]				
HA1 position 222 genotype[b]	Mild (n=205)	Severe (n=34)	Fatal (n=27)	Severe plus fatal (n=61)	All cases (n=266)
222D (wt)	92% (189)	82% (28)	59% (16)	72% (44)	88% (233)
222G	0% (0)	8.8% (3)	30% (8)	18% (11)	4.1% (11)
222E	7.3% (15)	2.9% (1)	7.4% (2)	4.9% (3)	6.8% (18)
222N	0.5% (1)	5.9% (2)	3.7% (1)	4.9% (3)	1.5% (4)
Total	**100%**	**100%**	**100 %**	**100 %**	**100 %**

1.7 Patogenese

Sesong influensa rammer 5-10% av verdens populasjonen årlig og gir 3-5 millioner alvorlige infeksjoner og 250-500 000 dødsfall (WHO 2011).

1.7.1 Smittemåte

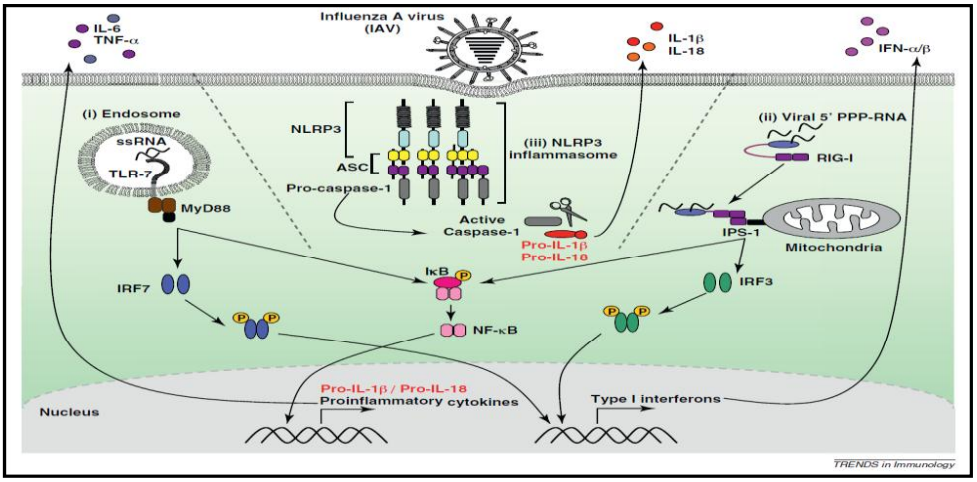
Influensavirus overføres ved dråpesmitte eller ved direkte kontakt . Utskillelse av virus starter gjerne litt før symptomene kommer, og stiger deretter betydelig de første 24-72 timer. Vanligvis er den smittede smitteførende fra tiden omkring symptomdebut og 3-5 dager framover. Symptomene er hodepine, feber, ømme muskler og ledd, smerter i brystet, tretthet, rennende nese og sår hals/svelg (fhi.no). Influensaviruset binder og replikerer i epitelceller både i øvre og nedre del av luftveiene. Viral replikasjon og immunologisk respons mot infeksjonen fører til destruksjon og tap av celler i luftveiene. Balansen mellom viral replikasjon og vertens immunsystem bestemmer utfallet av virusinfeksjonen.

1.7.2 Symptomer influensa A(H1N1)pdm09

Infeksjon med pandemi A(H1N1)2009 ga i de fleste tilfeller mildt sykdomsforløp. Symptombildet var i de fleste tilfeller som ved vanlig sesonginfluensa med unntak av gastrointestinal symptomer som ble observert mer hyppig ved pandemi influensa.

Flertallet av pasientene hadde et mildt sykdomsforløp men det forekom også mer alvorlige tilfeller med pneumoni, akutt lungesvikt og død. Det ble observert flere tilfeller hos yngre en hos personer over 60 år. Det antas at eldre kan ha en restimmunitet mot viruset fra tidligere sesonger.

1.7.3 Vertens respons



Figur 1.13. Vertens gjenkjennelse av influensavirus A. *Det medfødte, naturlige immunforsvaret gjenkjenner influensavirus A med minst tre ulike PRRs: (i) viralt enkelttrådet RNA gjenkjennes av TLR7 i endosomet. (ii) cytoslreseptoren RIG-I gjenkjenner viralt enkelttrådet RNA med 5'-trifosfat ende. (iii) aktiverer NLRP3 som igjen aktiverer caspase-1. Caspase-1 omdanner pro-IL-1β til modent IL-1β. TLR7 aktiverer nedstrøms IRF7 og NF-kB, mens RIG-I signaliserer via IPS-I lokalisert på mitokondriene som igjen aktiverer IRF7 og NF-kB. IRF7 og NF-kB aktiverer videre produksjon av type I interferoner, hvor NF-kB fungerer som en transkripsjonsfaktor for indusering av proinflammatoriske cytokiner som IL-6 og TNF-α og pro-formen av IL-1β (Pang et al., 2011).*

Influensavirus infiserer primært epitelcellene i luftveiene. I den tidlige fasen av influensavirus A infeksjon har det medfødte immunforsvaret en sentral rolle. Det medfødte, naturlige infeksjonsforsvaret består av nøkkelceller som dendrittiske celler monocytter og makrofager. Dendrittiske celler er såkalte antigen presenterende celle, de har egenskaper som gjør dem i stand til å hjelpe T-lymfocyttene i å gjenkjenne og reagere med fremmed materiale. Monocyttene har evne til å bevege seg ut av blodbanen og inn i vevet. Da endrer de ofte form og morfologi og betegnes som makrofager. Makrofagene finnes spredt utover i hele kroppen og har også evnen til å fagocytere (Lea 2006). Det medfødte immunforsvaret består også av ulike mønstergjenkjennende reseptorer (PRR: Pattern Recognizing Receptors) (figur 1.13). PRR finnes hos fagocytter og dendrittiske celler. Disse reseptorene er med på signaloverføring som igjen fører til en aktivering av cellene. Reseptorene gjenkjenner karakteristiske strukturegenskaper eller mønster av strukturegenskaper hos influensavirus A (Lea 2006). Ved infeksjon av influensavirus A er reseptoren retinoatgen I (RIG-I), Toll-liknende reseptor 7 (TLR7) og NOD-liknende reseptor (NLR) involvert. Betydningen av NLR virusgjenkjenning og indusering av medfødt immunrespons er ennå uklar (Ichinohe *et al*., 2009). I infiserte celler vil RIG-I i cytosol gjenkjenne influensavirus via 5'-trifosfat enden på enkelttrådet RNA (figur 1.13). Enkeltrådet RNA blir også gjenkjent i endosomet av TLR7. RIG-I og TLR7 induserer produksjon av proinflammatoriske cytokiner og type I interferoner (Pang *et al*., 2011). Cytokiner er for det meste lavmolekylære proteiner eller glykoproteiner

som virker som kjemiske kommunikasjonsmidler/signalmolekyler mellom celler (Lea 2006). Toll-liknende reseptor 3 (TLR3) gjenkjenner også RNA (dobbelttrådet) i endosomet og initierer en proinflammatorisk respons. Aktivering av interferin regulerende faktor 3 (TLR3) signaliserer en fosforylering av interferon regulerende faktor (IRF3) og interferon regulerende faktor 7 (IRF7) som igjen initierer genuttrykk av antivirale gener som interferon-beta (IFN-beta). Nylige studier viser at et cytoplasmisk kompleks kalt inflammasomet spiller en viktig rolle i influensavirus gjenkjennelse og forsvar (Ichinohe *et al*., 2009). Inflammasomet er et multiproteinkompleks som virker som en platform for aktivering av enzymet, caspase-1 som vider kløyver "umodne"/"pro" former av cytokiner som pro-interleukin-1 beta (IL-1b), pro-interleukin-18 (IL-18). Dette resulterer i sekresjon til ekstracellulære omgivelser og det settes i gang en generell inflammasjonsprosess.

Mekanismene for sykdom av influensa er fortsatt uklar men det er mye som tyder på at produksjon av proinflammatoriske cytokiner kan være årsaken til mange av de kliniske symptomene. IFN-alfa, tumor nekrosefaktor-alfa (TNF-alfa) og IL-1alfa og beta produseres tidlig i cytokin kaskaden. Disse cytokiner følges raskt av interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), makrofag inflammatorisk protein (MIPs) og monocytt kjemoattraktant protein (MCPs) (Van Reeth *et al*.,2000). IFN- alfa og- beta påvirker nabocellene til å syntetisere proteiner som hemmer proteinsyntese og fremmer degradering av viralt mRNA. Dette er førstelinjeforsvaret. NK (naturlig dreper)-celler og makrofager aktiveres av IFN-alfa og -beta som dermed øker sin cytotoksiske evne. Når virus foreligger ekstracellulært, som før infeksjon eller når infisert celle lyserer, kan det bindes av antistoffer som representerer det ervervede forsvaret/den adaptive immunresponsen. Antistoff kan nøytralisere virus ved blokkering av reseptorer på virusoverflaten. Binding av antistoff vil gi komplementaktivering og lysering av virus (Lea 2006). I tillegg til proinflammatoriske og andre immunregulerende cytokiner produseres også kjemokiner ved influensavirus A infeksjon. Kjemokinene produseres av forskjellige celletyper som makrofager, endotelceller, epitelceller, fibroblaster, celler i glatt muskulatur og bindevev. Kjemokiner er en undergruppe av cytokiner og virker hovedsakelig som kjemoattraktanter. Det vil si at de virker tiltrekkende på celler og får dem til å vandre i retning av kilden som skiller ut kjemokinene. Influensavirus A infiserte monocytter/makrofager skiller ut blant annet interferon gamma-induserende protein 10 (IP-10). IP-10 er en kjemoattraktant som aktiverer celler ved å reagerer med korresponderende reseptormolekyl på cellooverflaten. Denne aktiveringen kan gi økt ekspresjon av enkelte membranmolekyler eller uttrykke nye (Lea 2006). Kjemokin produksjonen øker tilstrømningen/rekruteringen av mononukleære celler til infeksjonsstedet

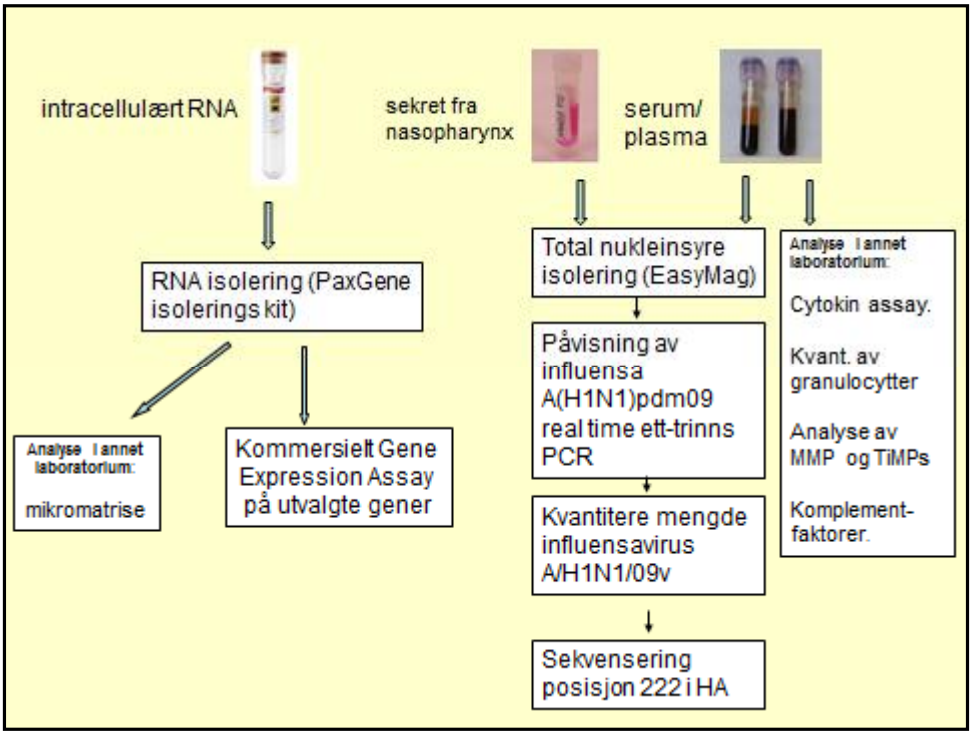
1.8 Mål med studiet.

Formålet med studien var å identifisere virus- og vertsfaktorer av betydning for sykdomsforløp ved pandemiinfluensa.

1. Studere endringer i virusgenomet i tidlig pandemifase, med hovedvekt på enkeltmutasjon i HA. Dette for å øke vår kunnskap om tilpassning av influensavirus hos mennesker.
2. Sudere vertens immunrespons mot pandemivirus i en tidlig infeksjonsfase ved akutt sykdom, og ved *in vitro* stimulering.

2. Materiale og metoder

2.1 Materiale intensivpasient studien.



Figur 2.1. Flytskjema over forløpet av intensivpasient studien. Figuren viser oversikt over de eksperimentelle analysene som ble utført på prøvematerialet fra de 7 hospitaliserte intensivpasientene . Figuren viser også analyser som ble utført ved annet laboratorium.

2.1.1 Pasientmateriale

Høsten 2009 ble det samlet inn prøvemateriale fra 7 hospitaliserte intensivpasienter med mistanke om influensa A(H1N1)pdm09 ved Akershus Universitets sykehus (Ahus) og Oslo Universitetssykehus Rikshospitalet (RH). Ved diagnosetidspunkt ble det tatt sekretprøve fra nasopharynx med pensel oppbevart i virus transportmedium. Etter bekreftet diagnose ble prøvematerialene plasma tappet på ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) rør, serum tappet på rør med gel og fullblod tappet på eget blodinnsamlingsrør (PAXgene Blood RNA Tube) samlet inn fra pasientene. Disse prøvematerialene ble samlet inn serielt med tidsintervall på ca 3 dager (nummerert med A, B og C. Eksempel pasient 1 dag en, 1A, dag tre, 1B, dag seks, 1C osv). To av pasientene var innlagt ved RH og innsamling av prøvemateriale ble foretatt der. Fra disse to pasientene foreligger det ikke serum eller prøvemateriale fra nasopharynx. To av pasientene innlagt ved Ahus ble underveis flyttet til RH og videre innsamling av prøvemateriale ble foretatt der.

I tillegg til prøver fra de hospitaliserte pasientene ble det samlet inn prøvemateriale fra en kontrollgruppe med tilsvarende alder og kjønnsfordeling som pasientene. Det ble innhentet samtykkeerklæring fra alle pasienter/kontroller og innsamlingen er godkjenning av REK og personvernombundet ved Ahus.

Plasma og serum ble sentrifugert og lagret i Nunc rør ved -80 grader. PAXgene Blood RNA-rørene ble etter innsamling oppbevart ved romtemperatur i minst 2 timer (maks 72 timer) før nedfrysning ved -20°C. Etter nedfrysning i 24 timer ble rørene flyttet til -80°C .

Alle prøvematerialene ble oppbevart ved -80°C frem til bruk.

2.1.2 Virus

H1N1 pandemisk (A/California/7/09) for tillaging av standardmateriale passert i egg.

2.2 Metoder intensivpasient studien: ekspresjon av immungener i fullblod.

2.2.1. Undersøkelse av cellulært RNA (PAXgene Blood RNA Tube) fra pasientprøvene.

Intracellulært RNA fra fullblod (2,5ml) fra de hospitaliserte pasienten ble tappet på PAXgene Blood RNA-rørene som er beregnet for oppbevaring og transport av blod og stabilisering av intracellulært RNA i et lukket system.

2.2.1.1 RNA isolering

Intracellulært RNA fra fullblod ble isolert ved bruk av PAXgene™ blod RNA kit (PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, Switzerland). Isoleringen ble utført i følge produsentens anbefalinger i håndbok for PAX®Blood RNA Kit, Versjon 2, april 2008, med noen modifikasjoner. Det ble utført ett ekstra re-appliserings trinn av ”flow through” materialet ved overføring av prøve til Paxgene RNA-spinn-kolonne og etter 1 minutts inkubering av elueringsbuffer på silikamembranen. Før isolering ble rørene tint ved romtemperatur i 2 timer før de ble sentrifugert. Deretter ble pelleten behandlet med Proteinase K.

2.2.1.2. Kvalitet- og kvantitetsvurdering av isolert RNA

Mengde total RNA isolert med PAXgene™blod RNA kit ble estimert ved bruk av NanoDrop spektrofotometer ND-1000 (Saveen Werner AB). Kvaliteten på intracellulært RNA ble i tillegg sjekket med hensyn til RNA-degradering og eventuelt DNA-kontaminering. Dette ble

utført ved bruk av Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA). Prøvene ble analysert i henhold til leverandørens protokoll "Agilent RNA 6000 Pico Kit Quick Start Guide".

Resultatet visualiseres i form av et elektroferogram hvor målt mengde fluorescens korrelerer med mengde RNA av en gitt størrelse. Elektroforesen skiller mellom 28s og 18s ribosomalt RNA (rRNA), hvor det blir beregnet en ratio som ideelt bør ligge mellom 1.8-2.0. I tillegg beregnes RNA Integrity Number (RIN). RIN-verdien representerer hele elektroforesebildet av RNA-prøven og inkluderer tilstedeværelse eller fravær av degraderte produkter. En RIN-verdi på 10 tilsvarer et fullstendig intakt RNA, mens en RIN-verdi på 1 tilsvarer et fullstendig degradert RNA(Schroeder *et al.,* 2006).

2.2.2. Analyser i annet laboratorium: mikromatrise og tilleggsundersøkelser.

Cellulært RNA fra første og siste prøver fra de hospitaliserte pasientene i tillegg til en kontrollgruppe ble analysert med GeneChip HT One-Cycle cDNA Synthesis Kit og GeneChip HT IVT Labeling (Affymetrix, Santa Clara, CA) ved Ullevål Universitetssykehus (Berdal *et al*).

I tillegg ble flere immunologiske parametre analysert ved bruk av ulike teknikker ved RH og Universitetet i Tromsø, se Berdal *et al*. fra plasma/serum prøvene. Se figur 2.1.

2.2.3.TaqMan® real-time PCR (Gene Expression Assays) på utvalgte gener.

Seks gener fra mikromatrisedataene (2.2.2) ble bekreftet ved bruk av real-time PCR med kommersielle primer og prober fra Applied Biosystems, se tabell 2.1. RPS13, som viste seg å være konstant uttrykt i mikromatrisedataene for alle pasienter og kontroller, ble valgt som referansegen.

Tabell 2.1. Kommersielle primer/prober TaqMan® Gene Expression Assays

Gen navn	Symbol	Assay ID
Interleukin 1, beta	IL1B	Hs01555410_m1
Interleukin 6	IL6	Hs00985639_m1
Tumor necrsosis factor	TNF	Hs00174128_m1
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL (IP-10)	Hs00171042_m1
Matrix metallopeptidase 8 (neutrophil collagenase)	MMP8	Hs01029057_m1
Defensin, alpha 4, corticostatin	DEFA4	Hs00157252_m1
Ribosomal protein S13	RPS13	Hs01945436_u1

2.2.3.1 cDNA syntese

Isolert RNA ble fortynnet med RNAse-fritt vann til 100 ng/µl før cDNA syntese. cDNA syntesen ble utført ved bruk av High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) med random primere. En 10 µl RT mastermiks ble laget av 2 µl 10x RT Buffer, 0,8 µl 25x dNTP (100mM), 2 µl 10x Random Primers, 1 µl MultiCsribe ™Reverse transcriptase og 4,2 µl Nuklease-fritt vann. 10 µl RT mastermiks ble blandet med 10µl RNA. Prøvene ble sentrifugert lett og plasseres på is inntil videre arbeid. RT reaksjonen ble utført på thermocycler (Dual Cycler fra VWR) ved følgende betingelser: 25°C i 10 minutter, 37°C i 120 minutter og deretter en innaktivering ved 85°C i 5 minutter. cDNA ble lagret ved -20°C frem til bruk.

2.2.3.2 Real-time PCR

4 µl cDNA ble amplifisert ved bruk av 10µl 2 x TaqMan® Gene Expression Master Mix, 5µl RNAse-fritt vann og 1µl utvalgte primere og prober fra 20x TaqMan® Gene Expression Assay i følge bruksanvisning.

Amplifiseringen ble utført på Applied Biosystems 7500 Fast instrument med følgende PCR betingelser: 50°C i 2 minutter, 95°C i 10 minutter etterfulgt av 40 sykler ved 95°C i 15 sekunder og 60°C i 1 minutt.

De utvalgte genene ble normalisert mot referansegenet, RPS13 og delta ct (Δct) ble beregnet. T-test ble utført på alle genene for å se på signifikante forskjeller i uttrykksnivå mellom

pasientene og kontrollene. Betingelsene tosidig fordeling og to utvalg med ulik varians ble valgt ved beregning med T-test (Berdal *et al*., 2011).

2.3 Metoder intensivpasient studien: viruspåvisning i pasientenes sekret fra nasopharynx og serum/plasma prøver.

Sekret fra nasopharynx ble undersøkt for influensa A og pandemi spesifikk influensa A ved diagnosetidspunkt. Pandemi influensa A mengde ble kvantitert fra serum/plasma prøvene. De influensa positive prøvene ble videre sekvensert i HA genet.

2.3.1 Totalnukleinsyre isolering av sekret fra nasopharynx og serum/plasma fra pasientene til influensapåvisning.

DNA og RNA fra nasopharynx sekret og serum/plasma ble isolert med NucliSense® EasyMag™ etter protokoll fra produsenten (BioMérieux, Boxtel, Netherland). EasyMag er en halvautomatisk metode for isolering av total nukleinsyrer (Boom *et al.,*1990 og1999). Nukleinsyrene binder magnetiske silikakuler ved tilstedeværelse av kaotropiske salter som finnes i lyseringsbufferen (4 M guanidinium thiocyanat). 500 µl serum/plasma og sekret fra nasopharynx ble tilsatt 2 ml lyseringsbuffer i egne prøvekassetter og inkubert 10 minutter i romtemperatur (Off-board lysis). 50 µl magnetiske kuler ble tilsatt før de ble satt inn i maskinen for automatisk isolering av nukleinsyrer. Serum/plasma ble eluert i 25 µl elueringsbuffer mens sekret fra nasopharynx ble eluert i 70 µl. Isolerte nukleinsyrer ble oppbevart ved -80°C frem til analyse. En oppkonsentrering av prøvemateriale fra pasient 2 ble utført ved å blande serum og plasma (800µl) og eluere i 25µl elueringsbuffer.

2.3.2 Real-time ett-trinns RT PCR for påvisning av influensa A(H1N1) fra pasientprøver(sekret fra nasopharynx og plasma/serum).

Nukleinsyrer ekstrahert fra sekret fra nasopharynx ble undersøkt for tilstedeværelse av influensavirus med en generell influensa A virus og en spesifikk influensa A H1N1pdm(09) real-time ett-trinns RT-PCR. Serum/plasma ble undersøkt kun med den spesifikke influensa A H1N1pdm(09) RT-PCR. Virusmengden i serum/plasmaprøvene ble kvantitert mot en plasmidstandard.

Alle real-time PCR-analysene ble utført med ABI7500 Fast instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA) og dataene analysert med tilhørende software version 4.0.2.

2.3.2.1 Generell påvisning av influensavirus A.

Det ble benyttet en modifisert real-time ett-trinns RT PCR protokoll fra (Ward *et al*.,2004). Denne protokollen detekterer et konservert område i matriksproteinet, segment 7. *SuperScript™III Platinum®One-Step Quantitative kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA) ble brukt i følge bruksanvisning fra leverandør. Reaksjonsmiksen ble laget ved å benytte 0,5 µl *SuperScript™III Platinum®Taq Med ,* 12,5 µl 2x Reaction Mix , 0,5 µl RNaseOUT™Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Applied Bisosystems), 400 nM primere og 200 nM probe med sekvenser som vist i tabell 2.2, per reaksjon. Det ble tilsatt 4 nM Mg konentrasjon per reaksjon, 0,5 µl ROX passiv refferanse fortynnet 1:10 (Applied Biosystems), 2,5 µl 10x Exo IPC Mix (Applied Biosystems) og RNase fritt vann til ett totalvolum på 20 µl. 5 µl templat ble tilsatt og amplifisert med følgende termosykling betingelser: revers transkripsjon ved 50°C i 30 minutter, denaturering ved 95°C i 2 minutter deretter 45 sykler med annealing ved 95°C i 15 sekunder og elongering ved 55°C i 30 sekunder.

Tabell 2.2 Primer og probe sekvenser til påvisning av influensa A virus.
a) LNA -probe.7=LNA C, 8=LNA T

Primernavn	Oligonukleotidsekvens 5' – 3'
InflA-F	aag-acc-aat-yct-gtc-acc-tct-ga
Infl-R	caa-akc-gtc-tac-gct-gca-gtc-c
InflA-P(LNA[a])	ttt-g8r-t8y-acg-ctc-a7c-gtg

2.3.2.2. Påvisning av influensa A(H1N1)pdm09.

For påvisning av influensa A(H1N1)pdm09 i nukleinsyrer av sekret fra nasopharynx og serum/plasma ble det benyttet en modifisert real-time ett-trinns RT PCR protokoll fra Robert Koch Institut (NIC influenza, 2009). Denne protokollen detekterer et konservert område i HA, segment 4. Samme reagenser og termosykling ble benyttet som beskrevet under 2.3.2.1, med 800 nM primere og 200 nM probe per reaksjon med sekvensene vist i tabell 2.3.

Tabell 2.3 Primer og probe sekvenser til påvisning av influensa A(H1N1)pdm09.

Primernavn	Oligonukleotidsekvens 5' – 3'
H1N1-F	tgg-gaa-atc-cag-agt-gtg-aat-cac
H1N1-R	cgt-tcc-att-gtc-tga-act-agr-tgt-t
H1N1_P	cca-cca-tgt-agg-acc-atg-agc-ttg-ctg-t

2.3.3 Kvantitering av influensa A(H1N1)pdm09

For kvantitativ påvisning av viruset i serum/plasma ble det laget en influensavirus A standard ved å bruke av TOPO TA cloning® kit for sequencing (Invitrogen) med PCR amplikon fra H1N1 pandemisk (A/California/7/09).

2.3.3.1 Tillaging av influensa A standardmateriale med kloning.

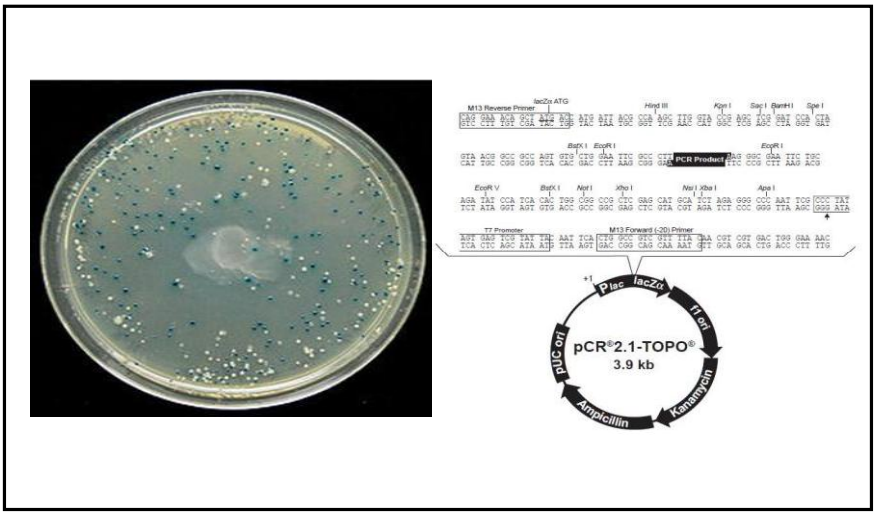
Kloning er en prosess som bruker levende bakterier til å lage mange replikater av et plasmid som inneholder insertet med det valgte PCR-produkt. Kloneprosessen består av to hovedtrinn, i trinn én blir et bestemt DNA fragment med kjent størrelse ligert i en vektor/plasmid og i neste trinn blir vektoren transformert inn i levende bakterier. Når bakteriene replikerer vil plasmidene kopieres tilsvarende.

PCR-produkt fra real-time ett-trinns RT PCR påvisning av influensa A(H1N1)pdm09 ble klonet inn i vektor pCR®2.1-TOPO fra TOPO TA cloning® kit for sequencing. Kloningsreaksjonen ble utført som beskrevet i bruksanvisning. Det ble laget en TOPO® klonereaksjon bestående av 2 µl ferskt RT-PCR produkt, 1 µl saltløsning, 2 µl vann og 1 µl TOPO vektor. Alle komponentene ble blandet forsiktig og inkubert ved romtemperatur i 5 minutter for deretter å bli satt på is. 2 µl av TOPO® klonereaksjon ble tilsatt kompetente celler (One Shot®TOP10F' *E.coli*), blandet forsiktig og inkubert 5-30 minutter på is. Cellene ble utsatt for varmesjokk ved 42°C i 30 sekunder uten risting og deretter satt umiddelbart satt på is igjen. Varmebehandling stimulerer opptak av fremmed DNA. Cellene ble tilsatt 250 µl S.O.C Medium og satt på risting ved 37ºC 300 rpm i 1 time.

Vektoren pCR®2.1-TOPO har områder som koder for ampicillin og kanamycin resistens, se figur 2.3. Dette gjør det mulig å dyrke *E.coli* med denne vektoren på agar tilsatt ampicillin eller kanamycin og dermed unngå vekst av andre bakterier. I dette forsøket ble det benyttet agar tilsatt kanamycin.

På LB-skåler med tilsatt kanamycin ble det spredt 50 µl fra hver transformasjon, 40 µl 40 mg/ml X-gal og 40 µl 100 mm IPTG, i tillegg til 20 µl S.O.C medium rett før tilsetting av sjokkbehandlet klonereaksjon. Skålene ble inkubert over natt ved 37°C med risting (100 rpm). For å identifisere plasmidkolonier som har innsatt fremmed DNA ble *E. coli* enzymet beta-galaktosidas (lac Z) brukt. Ved korrekt ligering vil PCR produktet settes inn i *lacZ* genet i vektoren, se figur 2.3. Dette enzymet kløyver X-gal som etter kløyving gir en blå farge. Ved ligering av DNA i lac Z mistes denne egenskapen til å danne en funksjonell beta-

galaktosidase som spalter x-gal og koloniene blir hvite. Dette gjør det mulig å visuelt skille mellom kolonier med innsatt DNA (hvite) og kolonier uten innsatt DNA (blå), se figur 2.3.



Figur 2.3. Til venstre: LB-skål med koloner som skiller mellom kolonier med innsert (hvite) og uten (blå). Til høyre: Vektoren pCR®2.1-TOPO.

Slemmet opp 8-10 hvite kolonier i LB buljong og inkubert ved 37ºC med risting over natt.

2.3.3.2 Isolering av plasmid DNA

Plasmid DNA ble renset ved bruk av PureLink™Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen) i henhold til bruksanvisning fra produsenten. PureLink™Quick Plasmid Miniprep Kit isolerer plasmid DNA (opp til 30µg) fra *E.coli* celler og benytter alkaline/SDS og kolonne basert rensing. Det rensede plasmidet ble oppbevart ved -20°C frem til bruk.

Influensa A(H1N1)pdm09 real-time ett-trinns RT PCR, som beskrevet tidligere (pkt 2.3.2.2.), ble utført på det rensede materiale for å bekrefte tilstedeværelse av insert/produkt. Mengde plasmid DNA ble estimert ved bruk av NanoDrop spektrofotometer ND-1000. For ytterligere verifisering av produktet ble plasmid med insert sekvensert med M13 Revers og M13 forward primer.

2.3.3.3 Tillaging av standardkurve

Spektrofotometrisk måling og Avogadros konstant ble benyttet til å estimere antall kopier av influensa A standardmaterialet. Antall kopier ble beregnet ved bruk av Avogadros tall. Denne beregningen ble gjort på følgende måte:

Beregner vekt i Daltons (Da) (g/mol) for plasmid med insert.

Plasmid: 3900 baser

Insert: 84 baser

3984 * 660Da g/mol=2629440 g/mol

Vekt i Da deles på Avogadros tall ($6{,}02214199*10^{23}$ mol^{-1})

$$\frac{2{,}629440*E6}{6{,}02214199*E23} = 4{,}4*10E\text{-}18 \text{ g/molekyler}$$

$$\frac{6{,}63*E\text{-}8 \text{ g/µl}}{4{,}4*E6\text{-}18 \text{ g/molekyler}} = 1{,}5*E10 \text{ molekyler/µl}$$

En 6-log fortynningsserie av standardmateriale ble laget med antall plasmidkopier fra 1,5 til 1,5x10*6. Fortynningsserie ble satt opp i triplikater og analysert med influensa A(H1N1)pdm09 real-time ett-trinns RT PCR. Det ble generert en lineær standardkurve som ga sammenheng mellom utgangsmengde templat og antall PCR-sykler. PCR-effektivitet ble målt.

2.3.4. DNA sekvensering

Sekvensering av aktuelle PCR produkt er utført med BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit fra Applied Biosystems, på instrument ABI 3130xl Genetic Analyzers (Applied Biosystems). Til sekvenseringen ble det benyttet 1µl BigDye® Terminator v3.1, 1µl 5x sekvenseringsbuffer, 1µl forward eller revers primer med konsentrasjon 3,5nM, 6µl dH2O og 2 µl cDNA/DNA plasmid. Produktet ble amplifisert med følgende termosykling betingelser; 25 ºC i 10 minutter, 37 ºC i 120 minutter og til slutt 85 ºC i 5 minutter for så å bli kjølt ned til 4 ºC.

Resultatene ble analysert ved bruk av Sequencing Analysis Software (Applied Biosystem).

2.3.4.1 Sekvensering av plasmid

De rensede plasmidene positive for influensa A(H1N1)pdm09 ble sekvensert for å verifisere amplikon. DNA sekvenseringen ble utført som beskrevet under pkt. 2.3.4. DNA sekvensering ble utført med med 3,2µM av primerene M13 Forward og M13 Reverse, se figur 2.3.

2.3.4.2 Sekvensering av posisjon 222 i HA

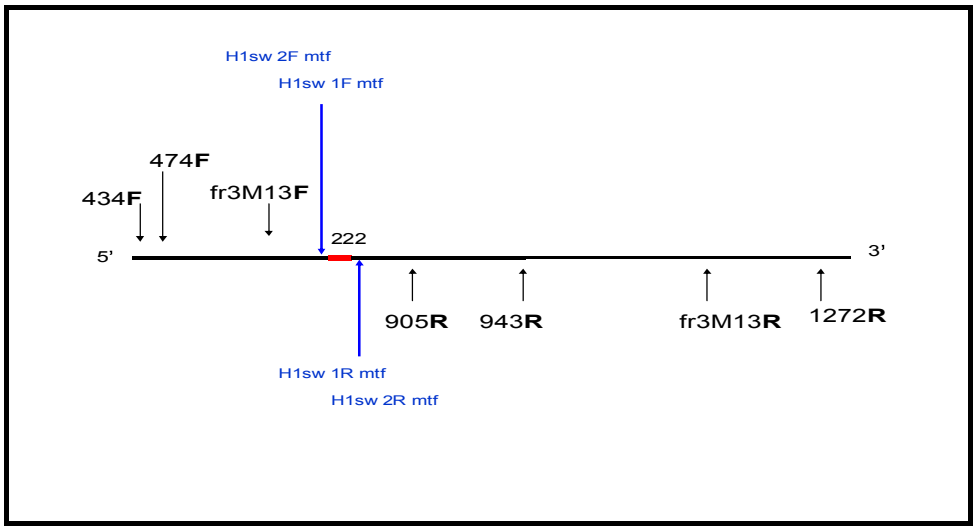
For å bekrefte G eller D i posisjon 222 fra nasopharynx sekret og serum/plasma prøver fra pasienten ble nytt cDNA laget og nested PCR utført.

2.3.4.2.1 cDNA syntese

cDNA ble laget ved å benytte SuperScript™III Reverse Transcriptase (Invitrogen), som har redusert RNase H aktivitet og økt termostabilitet. 1 µl random primer, 1 µl dNTP og 11 µl isolert RNA ble inkubert ved 65°C i 5 minutter for denaturering av RNA og deretter avkjølt raskt på is i 1 minutt. En blanding med 4µl 5x First-Strand buffer, 1 µl 0,1 M DTT, 1 µl 40 U RNaseOUT™ (Invitogen) og 1 µl 200U SuperScript™ III RT (Invtrogen) ble tilsatt. RNA ble transkribert med følgende termiske betingelser: 25°C i 5 minutter, 50°C i 45 minutter og til slutt 70°C i 15 minutter. cDNA ble oppbevart ved 4°C eller ved -20°C dersom videre arbeid ikke ble utført samme dag.

2.3.4.2.2 Nested PCR

For å se nærmere på nukleotidsekvensen i posisjon 222 i HA ble det utført nested PCR i dette området. Nested PCR ble utført på alle influensa A(H1N1)pdm09 positive serum, plasma og nasopharynxprøver. Primersekvensene som ble brukt benyttes til HA sekvensering ved FHI (Olav Hungnes), se figur 2.4 og tabell 2.4. I tillegg ble det for de svakeste influensa A(H1N1)pdm09 positive serum/plasmaprøvene designet to sett spesifikke primerpar i område rundt posisjon 222 i HA for å utføre nested PCR, se figur 2.4 (merket blått) og tabell 2.4. Primerne ble designet ved bruk av primer 3 og deretter med Primer Express v3.0 (?) (Applied Biosystems). Ved hjelp av nested PCR med disse egenproduserte primerne ble det påvist amplifikasjonsprodukt til sekvensering.



Figur 2.4. 7 ulike primer ble benyttet som alle ligger i området rundt posisjon 222 (rødt) i HA. H1sw primerene i blått ble benyttet til de svakt positiv influensa A passientprøvene.

Tabell 2.4

Primernavn	**Oligonukleotidsekvens 5' – 3'**
H1-434F	cga aca aag gtg taa cgg cag cat
H1-474F	ggt gta acg gca gca tgt cct cat
H1-fr3M13F	tgt aaa acg acg gcc agt tca tac cca aag ctc agc aa
H1-fr3M13R	cag gaa aca gct atg acc tcc atc tac cat ccc tgt cc
H1-1272R	cag gaa aca gct atg acc tct tta ccy act rct gtg aa
H1-905R	gca ccc ttg ggt gtt tga caa gtt
H1-943R	cag gaa aca gct atg acc gaa akg gga grc tgg tgt tta
H1sw 1F mtf	ggg-cat-tca-cca-tcc-atc-ta
H1sw 2F mtf	agt-tca-agc-cgg-aaa-tag-ca
H1sw 1R mtf	cca-gca-ttt-ctt-tcc-att-gc
H1sw 2R mtf	ttt-tgt-ctc-ccg-gct-cta-ct

Første PCR ble satt opp med primerparene H1-sw-434f og H1-1272R . Svake positive prøver for influensa A(H1N1)pdm09 ble i tillegg satt opp med primerparene H1-sw-474F OH og H1-1272R. Begge primerparene ga produkter opp mot 700 nukleotider, se figur 2.5. Produktene ble videre satt opp i andre PCR med tre forskjellige primerpar H1v-474 OH og H1-1272R, H1-sw-434F og H1-fr3M13R , H1-fr3M13f og H1-sw-905R. PCR produkt fra primer sett H1v-474 OH og H1-1272R ble sekvensert med H1v-474F OH, H1-fr3M13F, H1-1272R og H1-fr3M13R. PCR produkt fra primersett H1-sw-434F og H1-fr3M13R ble sekvensert med primerene H1-sw-434f , H1v-474F OH, H1-fr3M13F, H1-frM13R og H1-sw-905R. PCR-

produkt fra H1-fr3M13F og H1-sw-905R ble sekvensert med primerene H1-fr3M13F og H1-sw-905R. De fire designede primerene ble benyttet på de svakeste prøvematerialene.

PCR-reaksjonenen ble utført ved å benytte Platinium®*Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 2,5 µl 10 x PCR buffer uten Mg, 0,5 µl 10mM dNTP, 0,75 µl 50mM MgCl, 0,5 µl 25µM forward og revers primere, 0,1 µl Platinium®*Taq* DNA polymerase, 15,15 µl RNase fritt vann. 20 µl reaksjonsmiks og 5 µl templat ble analysert med følgende termosykling betingelser: 94°C i 2 minutter enzymaktivering, deretter 25 sykler PCR amplifiserting ved 94°C i 30 sekunder, 55°C i 30 sekunder og 72°C i 1 minutt, deretter 4°C. Termosykling program for andre PCR er lik som første med unntak av antall sykler som ble økt til 30.

```
361   CAA TTG AGC TCA GTG TCA TCA TTT GAA AGG TTT GAG ATA TTC CCC   405
121    Q   L   S   S   V   S   S   F   E   R   F   E   I   F   P    135
                                           H1-434F     H1-474F
406   AAG ACA AGT TCA TGG CCC AAT CAT GAC TCG AAC AAA GGT GTA ACG   450
136    K   T   S   S   W   P   N   H   D   S   N   K   G   V   T    150

451   GCA GCA TGT CCT CAT GCT GGA GCA AAA AGC TTC TAC AAA AAT TTA   495
151    A   A   C   P   H   A   G   A   K   S   F   Y   K   N   L    165
                                       H1-fr3M13F
496   ATA TGG CTA GTT AAA AAA GGA AAT TCA TAC CCA AAG CTC AGC AAA   540
166    I   W   L   V   K   K   G   N   S   Y   P   K   L   S   K    180
                                                           H1sw_1F_mtf
541   TCC TAC ATT AAT GAT AAA GGG AAA GAA GTC CTC GTG CTA TGG GGC   585
181    S   Y   I   N   D   K   G   K   E   V   L   V   L   W   G    195

586   ATT CAC CAT CCA TCT ACT AGT GCT GAC CAA CAA AGT CTC TAT CAG   630
196    I   H   H   P   S   T   S   A   D   Q   Q   S   L   Y   Q    210

631   AAT GCA GAT GCA TAT GTT TTT GTG GGG ACA TCA AGA TAC AGC AAG   675
211    N   A   D   A   Y   V   F   V   G   T   S   R   Y   S   K    225
      H1sw_2F_mtf
676   AAG TTC AAG CCG GAA ATA GCA ATA AGA CCC AAA GTG AGG GAT CAA   720
226    K   F   K   P   E   I   A   I   R   P   K   V   R   D   Q    240
                                           H1sw_2R_mtf
721   GAA GGG AGA ATG AAC TAT TAC TGG ACA CTA GTA GAG CCG GGA GAC   765
241    E   G   R   M   N   Y   Y   W   T   L   V   E   P   G   D    255

766   AAA ATA ACA TTC GAA GCA ACT GGA AAT CTA GTG GTA CCG AGA TAT   810
256    K   I   T   F   E   A   T   G   N   L   V   V   P   R   Y    270
              H1sw_1F_mtf
811   GCA TTC GCA ATG GAA AGA AAT GCT GGA TCT GGT ATT ATC ATT TCA   855
271    A   F   A   M   E   R   N   A   G   S   G   I   I   I   S    285
                                       H1-905R
856   GAT ACA CCA GTC CAC GAT TGC AAT ACA ACT TGT CAG ACA CCC AAG   900
286    D   T   P   V   H   D   C   N   T   T   C   Q   T   P   K    300
              H1-943R
901   GGT GCT ATA AAC ACC AGC CTC CCA TTT CAG AAT ATA CAT CCG ATC   945
301    G   A   I   N   T   S   L   P   F   Q   N   I   H   P   I    315

946   ACA ATT GGA AAA TGT CCA AAA TAT GTA AAA AGC ACA AAA TTG AGA   990
316    T   I   G   K   C   P   K   Y   V   K   S   T   K   L   R    330

991   CTG GCC ACA GGA TTG AGG AAT GTC CCG TCT ATT CAA TCT AGA GGC   1035
331    L   A   T   G   L   R   N   V   P   S   I   Q   S   R   G    345
                                                       H1-fr3M13R
1036  CTA TTT GGG GCC ATT GCC GGT TTC ATT GAA GGG GGG TGG ACA GGC   1080
346    L   F   G   A   I   A   G   F   I   E   G   G   W   T   G    360

1081  ATG GTA GAT GGA TGG TAC GGT TAT CAC CAT CAA AAT GAG CAG GGG   1125
361    M   V   D   G   W   Y   G   Y   H   H   Q   N   E   Q   G    375

1126  TCA GGA TAT GCA GCC GAC CTG AAG AGC ACA CAG AAT GCC ATT GAC   1170
376    S   G   Y   A   A   D   L   K   S   T   Q   N   A   I   D    390

1171  GAG ATT ACT AAC AAA GTA AAT TCT GTT ATT GAA AAG ATG AAT ACA   1215
391    E   I   T   N   K   V   N   S   V   I   E   K   M   N   T    405
          H1-1272R
1216  CAG TTC ACA GCA GTA GGT AAA GAG TTC AAC CAC CTG GAA AAA AGA   1260
406    Q   F   T   A   V   G   K   E   F   N   H   L   E   K   R    420
```

Figur 2.5. Sekvens fra HA med, posisjon 222, markert i gult. Viser primerene som ble benyttet ved sekvensering.

2.3.4.2.3 Agarose gelelektroforese

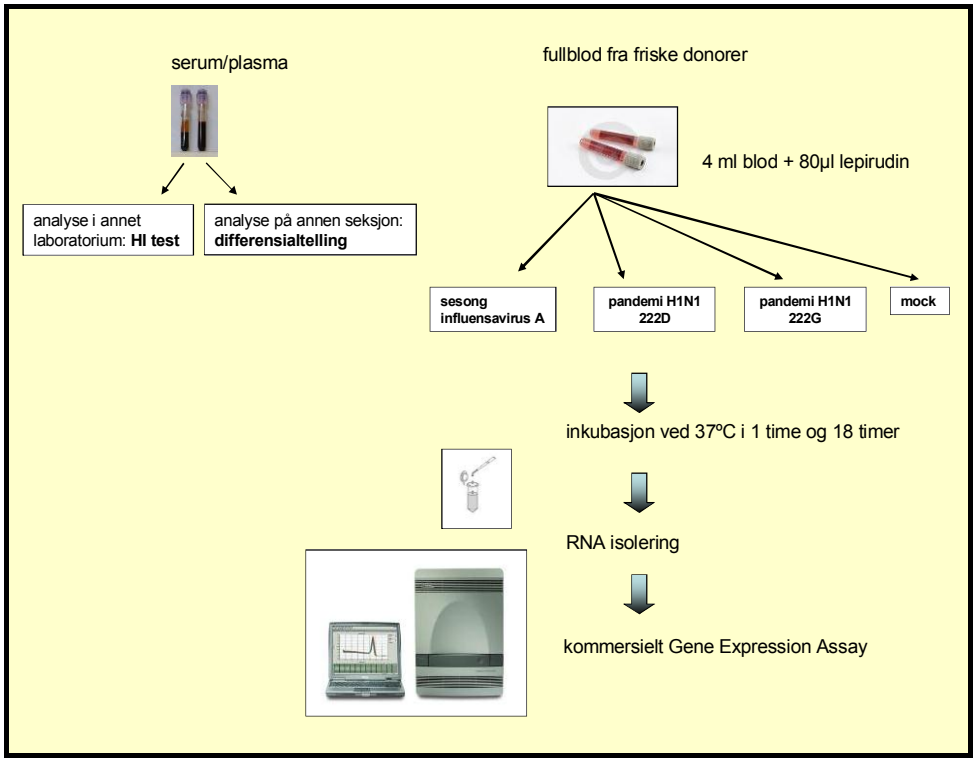
Etter andre nested PCR ble produktene visualisert ved agarose gelelektroforese hvor DNA-fragmentene separeres etter størrelse. Det ble laget en 1% seaKem LE Agarose (0,5g agar løst i 50 mL 1xTBE buffer) med 3 µl CyberSafe (DNA gel stain, Invitrogen) som gjør DNA synlig ved å fluorisere i UV-lys. 4 µl PCR-produkt blandet med 1 µl loading buffer og 4µl Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) ble tilsatt brønnene i gelen og kjørt ved 70V i 45 minutter. Gelen ble visualisert med GelDoc.

PCR produkt visualisert med agarose gelelektroforese ble videre sekvensert som beskrevet under 2.3.4.

2.4 Materiale *in vitro* stimuleringsforsøket

For å se på aktivering av immunresponsen med utvalgte influensavirus isolater ble fullblod fra seks friske givere stimulert med tre ulike influensavirus A isolater.

I forkant ble det utført ett pilotstudie for å optimalisere metoden, med henblikk på virusmengde, inkubasjonstider og materiale (antikoagulans, og fullblod vs buffy coat) se pkt. 2.4.2.3.



Figur 2.6. Flytskjema over forløpet av stimuleringsforsøket. Viser oversikt over prøvematerialet, virusvarianten og de eksperimentelle analysene som ble utført på prøvematerialet fra de 6 giverne i stimuleringsforsøket.

2.4.1 Givere

De seks giverene i forsøket hadde ikke tatt årets influensavaksine eller hatt influensalignende sykdom den aktuelle sesongen (vinter 2010/11). Giverene hadde en alder og kjønnsfordeling som tilsvarte de hospitaliserte pasientene fra intensiv studiet. Det ble innhentet samtykkeerklæring fra alle givere og innsamlingen er godkjent av REK og personvernombundet ved Ahus.

Fra alle giverne ble det tappet fullblod på glass uten tilsetning (BD…vacutainer..) og serum tappet på rør med gel. 4 ml fullblod ble blandet med 80 µl antikoagulans middel, refludan 2,5 mg/ml (løst i steril PBS) med virkestoffet lepirudin. Serum ble sentrifugert.

Til pilot ble det benyttet to givere. Fullblod ble blandet med lepirudin som beskrevet over i tillegg til blod tappet på EDTA-rør.

2.4.2 Virus

Tre ulike H1N1 influensavirus A isolater ble benyttet, 222D og 222G influensa A(H1N1)pdm09 i tillegg til pre-pamdemisk sesong influensavirus A/H1N1/2009. De to pandemivirus-variantene er isolert i samme tidsperiode i begynnelsen av pandemi utbruddet i Norge i 2009 og er dermed fylogenetisk i nær slekt, dette for å begrense betydningen av andre mutasjoner i genomet. Alle virusisolatene var passert i Madin-Darby canine kidney (MDCK) kultur ved FHI. Begge pandemi virusisolatene ble sekvensert for å verifisere nukleotidsekvensen i posisjon 222 på HA som beskrevet under….

Til stimuleringsforsøket:

- 222D influensa A(H1N1)pdm09 (3487-2) passert i MDCK
- 222G influensa A(H1N1)pdm09 (4158) passert I MDCK
- sesong influensavirus A/H1N1/2009 (996) passert I MDCK

2.4.3 Genene

Tabell 2.5. Kommersielle primer og prober/TaqMan® Gene Expression Assays

Gen navn	Symbol	Assay ID
Granulocytt-proteiner		
Defensin, alpha 4, corticostatin	DEFA4	Hs00157252_m1
Elastase	ELANE	Hs00236952_m1
Myeloperoxidase	MPO	Hs00924296_m1
Lactotransferrin	LTF	Hs00914334_m1
Nøytrofile kollagenaser og inhibitorer		
Matrix metallopeptidase 8 (neutrophil collagenase)	MMP8	Hs01029057_m1
Metallopeptidase inhibitor 1	TIMP1	Hs00171558_m1
Metallopeptidase inhibitor 3	TIMP3	Hs00165949_m1
Cytokiner		
Interleukin 1, beta	IL1B	Hs01555410_m1
Interleukin 6	IL6	Hs00985639_m1
Interleukin 10	IL10	Hs00961622_m1
Interleukin 17	IL17	Hs00174383_m1
Interleukin 18	IL18	Hs01038788_m1
Tumor necsosis factor	TNF	Hs00174128_m1
Nod like receptor	NLRC	Hs00918082_m1
Kjemokiner		
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL (IP-10)	Hs00171042_m1
Kjemokinreseptor		
Chemokine (C-X_C motif) receptor 3	CXCR3	Hs00171041_m1
NK-celle markør		
CD244	CD444	Hs00900271_m1
T-lymfocytter		
CD4	CD4	Hs01058407_m1
Referansegener		
Actin, beta	ACTB	Hs99999903_m1
Ribosomal protein S13	RPS13	Hs01945436_u1

2.5 Metoder stimuleringsforsøket

I stimuleringsstudiet er fullblod benyttet for at alle mediatorer, celler og immunsignalstoffer til stede for på best mulig måte gjennskape *in vivo* omgivelser.

En pilotundersøkelse på 2 givere ble foretatt i forkant for å optimalisere ekstraksjonskit på prøvemateriale med antikoagulans (lepirudin). Ett EDTA- rør og ett rør tilsatt lepirudin ble tappet fra samme giver, isolert samtidig på RiboPure isolerngskit, og RNA kvaliteten ble sjekket ved bruk av nanodrop og Bionalyzer. Det ble i tillegg gjort en differensialtelling og utført en real-time PCR på beta-Actin og GAPDH. Mengde virus/hvite blodlegemer (10, 100, 1000 og 10000 virus partikler/celle), inkubasjonstider (1, 6, 12 og 18 timer) samt fullblod vs buffy coat (inkubert 1 og 6 timer med 1000 og 10000 virus partikler/celle) ble også undersøkt. Alle pilotundersøkelsene til stimulering ble utført med A/H1N1pdm 222D

2.5.1 RNA isolering

Total cellulær RNA fra stimulert fullblod ble isolert ved bruk av RiboPure™ -Blood kit som renser RNA med bruk av solid-fase ekstraksjons metodikk på glassfiber filter. Cellene lyseres med guanidinium-basert løsning og RNA renses med fenol/chloroform ekstraksjon. Isolering av RNA ble utført i følge produsentens anbefalinger med modifikasjon i forhold til elueringsvolum. 50 µl forvarmet (75ºC) elueringsbuffer ble tilsatt og inkubert i 20 sekunder før sentrifugering ved maks hastighet 20-30 sekunder, så ble de eluerte 50 µl re-applisert og trinnet ble gjentatt. Isolert RNA ble oppbevart i elueringsbuffer ved -80°C frem til bruk.

Ettersom isoleringskitet ikke var validert for lepirudin som antikoagulant ble det i forkant tappet fullblod med lepirudin som antikoagulant samt EDTA som begge ble renset ved bruk av RiboPure™ -Blood kit, mengde RNA ble målt på NanoDrop, RNA kvalitet ble analysert på Bioanalyzer og det ble satt opp en PCR på GAPDH og beta-ACTIN.

2.5.2. Kvantitering av virusmengde i cellesupernatant før stimuleringsforsøk

For å estimere mengde virus i isolatene ble det laget en standard av sesong influensavirus A ved å bruke pCR®2.1-TOPO vektor. Det ble benyttet PCR amplikon fra real-time ett-trinns RT PCR for influensavirus A matriksproteinet som beskrevet tidligere. Viralt cDNA ble kvantitert ved å lage en 10-folds fortynningsrekke av plasmidet.

Virsuisolatene ble tilsatt i en konsentrasjon lik 10 virus per celle i totalvolum på 600 µl. Referanseområdet for hvite blodceller er 4.0 - 11.0 10^9/L (ref..). I dette studiet ble antall hvite blodceller for hver giver antatt å være $7x10^9$/L. Stimuleringen ble utført i risteinkubater ved

37°C (RS Biotech, Irvine, UK) og de virusinfiserte cellene ble inkubert ved to ulike tidspunkt, 1 time og 18 timer.

2.5.2.1 cDNA syntese

1 µg av total RNA ble revers transkribert (RT) til cDNA ved å benytte High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) som beskrevet under 2.2.3.1.

2.5.2.2 Real-time PCR

Ut i fra resultatene fra intensivpasientstudiet, med aktuelle opp-eller nedregulerte gener, ble 18 ulike primer og prober valgt til ekspressjonsanalyser i tillegg til referansegenet RPS13 (Ribosomal protein S13), fra Applied Biosystems, se tabell 2.5. Som negativ/ubehandlet kontrollprøve (mock) ble supernatanten fra cellepassasjene benyttet. Ct-verdiene ble benyttet til å se på forskjeller i genuttrykk. Ct-verdiene for hver prøve inklusivt negativ kontroll(mock) ble normalisert mot den korresponderende Ct-verdien til referansegenet, RPS13. Beregnet delta Ct, ΔCt, som er: Ct for gen av interesse - Ct for RPS13. Deretter ble ΔΔCt (ΔCt gen av interesse – ΔCt mock) beregnet og videre brukt til å beregne $2^{-\Delta\Delta CT}$ (fold change). Alle verdier under 1 ble deretter beregnet om med formelen $½^{-\Delta\Delta ct}$.

T-test ble utført på delta Ct-verdiene for å se på eventuelle signifikante forskjeller mellom de ulike virusisolatene.

Ved å beregne opp-eller nedregulering på denne måten antar man at forventet effektivitet på PCR for gen av interesse og referanse genet er tilnærmet lik.

2.5.2.3 Pilotstudiet

I pilotstudiet ble isolert RNA fra fullblod av 2 friske givere og virusisolat H1N1 pandemisk (A/California/7/09) med D i posisjon 222 ble benyttet til stimulering.

2.5.2.3.1 Viruskonsentrasjon og inkubasjonstider

Total cellulært RNA ble isolert med RiboPure isoleringskit fra to givere. Lepirudin 50 µg/mL ble brukt som antikoagulansmiddel. De stimulerte fullblodprøven ble inkubert i 1, 6, 12 og 18 timer og med ulike viruskonsentrasjoner 10, 100, 1000 og 10 000 influensagenom kopier per blodcelle. Studie ble delt i to med en giver per forsøk. Dette gir ikke grunnlag for statistiske beregninger. Bare noen gener ble valgt…

Ct-verdiene for hver av de aktuelle genene ble normalisert mot referansegenet RPS13, og det ble beregnet delta delta ct for alle resultatene og fold change for alle med delta delta ct ≥ 3 og ≤ -3. Kun et utvalg gener ble undersøkt og analysert i pilotstudien.

2.5.2.3.2 Fullblod versus buffycoat

En sammenligning mellom fullblod og buffycoat ble utført der de stimulerte blodprøvene ble inkubert i 1 og 6 timer med to forskjellige viruskonsentrasjoner, 1000 og 10 000 influensagenom kopier per blodcelle.

2.5.3 Analyse ved annen seksjon: differensialtelling

Det ble utført en differensialtelling av fullblodet med lepirudin for å telle mengde hvite blodlegemer og fordeling av ulike celletyper ved seksjon for hematologi ved Ahus.

2.5.4 Analyse i annet laboratorium: HI test

Mengde antistoff mot influensa i blodet ble analysert ved bruk av HI-test på serumprøvene, mot A/Cal/7/2009, utført ved Veterinærinstituttet (Anna Germundsson). Et titer lik 40 eller mer regnes som positiv for antistoff mot A/Cal/07/09.

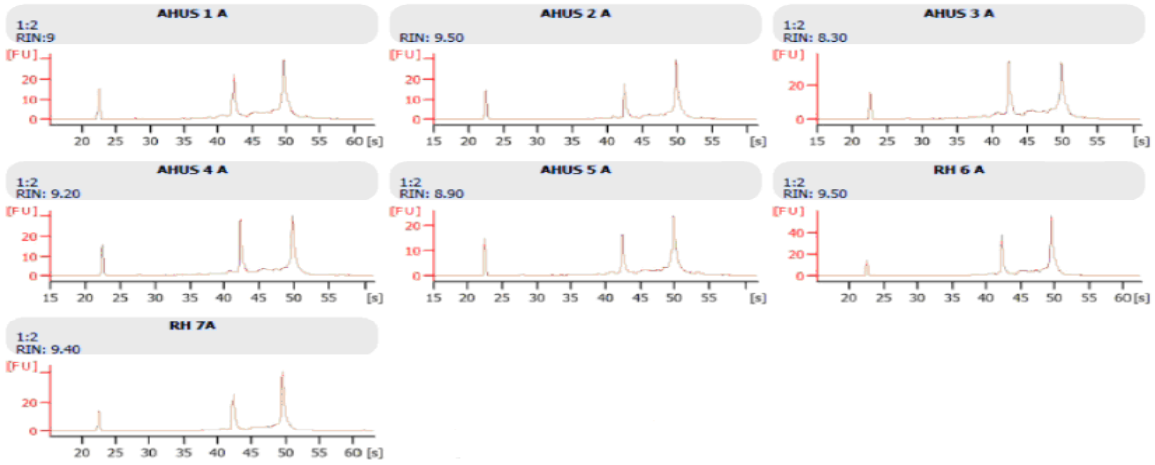
3. Resultater

3.1 Resultater intensivpasient studien

3.1.1 Genuttrykk

3.1.1.1 RNA-kvalitet av isolert cellulært RNA (PAXgene Blood RNA-rør) til genuttrykk.

RNA utbytte for blodprøvene renset med PAXgene Blood var mellom 80 og 1170 ng/µl, med en ratio 260/280 på mellom 2,08 til 2,13. RNA-kvaliteten på det intracellulært RNA fra de 7 pasientene og kontrollene ga gode RIN verdier mellom 8,3 og 9,5 (se pkt 2.2.1.2). Prøvene viste ingen tegn til degradering, og var derfor godt egnet til genuttryksanalyser (figur 3.1).



Figur 3.1 RNA-kvalitet *Vurdering av RNA-kvaliteten ved analysering med Agilent 21000 Bioanalyzer for første prøve (A) tatt i tidsserien av de 7 hospitaliserte pasientene. Pasientprøve 6 og 7 ble innsamlet ved RH, de resterende ved Ahus. De tre fraksjonene viser markøren og ribosomalt-RNA for henholdsvis 18S og 28S.*

3.1.1.2 Bekreftelse av mikromatrisefunn med TaqMan® real-time PCR

Genuttrykk, som ble utført ved annet laboratorium, viste at 370 gener var enten 2-folds oppregulert eller minst 50% nedregulert hos de hospitaliserte pasientene. Blant de mest oppregulerte genene var mange knyttet til nøytrofil leukocyttdifferensiering og aktivering, eller kodet for nøytrofile proteiner som CD177 eller matriks metalloproteinaser som MMP-8. På proteinnivå, utført ved annet laboratorium, ble det også observert aktivering av granulocytt aktiverende proteiner som elastase og laktoferrin. NK-celle assosierte gener var blant de mest nedregulerte genene samt lymfocytt overflate gener (CD4, CD2, CD1c, C3XCR1). Ingen gener knyttet til inflammasjons cytokiner eller interferon var oppregulert. I kontrast til dette funnet på mRNA-nivå ble det i plasma funnet signifikante forskjeller på proteinnivå hos 16 av

29 cytokiner. Det ble påvist forhøyede verdier av IFN-α, samt proinflammatoriske cytokiner som TNF-a, IL-6, IFN-γ, IL-17, IL-9 samt flere kjemokiner og da spesielt IP-10 (> 100-fold). Pasientene 1 og 5 hadde den kraftigste responsen og det alvorligste klinisk bilde (Berdal *et al*.,2011).

Resultatene fra Real-Time PCR (Gene Expression Assays) i vårt studium, analysert med et utvalg gener, bekreftet mikromatrise funnene. Mengde mRNA for de proinflammatoriske genene IL-6, IL-1B, TNF og kjemokin IP-10 fra pasientene var ikke signifikant forskjellig fra kontrollene med en p-verdi høyere enn 0,05. Til gjengjeld ble MMP8 og DEFA4 funnet signifikant overuttrykt hos pasientene i forhold til kontrollene (tabell 3.1) og dette samsvarer med mikromatrise funnene.

Tabell 3.1. P-verdi fra t-test *T-test av Δct-verdier normalisert mot referansegenet, RPS13 ,for pasientgruppen og kontrollgruppen med p-verdi ≤ 0,05.*

p-verdi fra t-test (tosidig fordeling, to utvalg med ulik varians)					
IL-6	**TNF**	**IP-10**	**IL-1B**	**MMP8**	**DEFA4**
0,32	0,26	0,50	0,90	1,15E-07	0,00155257

3.1.2 Påvisning og kvantitering av influensavirus A.

3.1.2.1 Sekret fra nasopharynx fra de hospitaliserte pasientene.

Isolert nukleinsyrer fra sekret fra nasopharynx fra hospitaliserte pasienter ved Ahus var positive i begge influensavirus RT-PCR, den generelle som har matrixgenet som target, og den A(H1N1)pdm09 HA spesifikke RT-PCR (tabell 3.2). Pasientene 6 og 7 var innlagt ved RH og det foreligger derfor ingen tilgjengelige resultater fra influensavirus A påvisning fra sekret fra nasopharynx fra disse pasientene. Hos 2 av pasientene ble det observert høye ct-verdier, over 35, dvs relativt lite virus i øvre luftveiesprøver hos disse pasientene, til tross for alvorlig viral pneumoni. Virus mengde ble ikke kvantitert da mengde prøvemateriale fra sekret fra nasopharynx ikke kan standardiseres.

Pasient	Inf A(H1N1)pdm09 (ct)
1	25,8
2	31,6
3	35,4
4	38,2
5	25

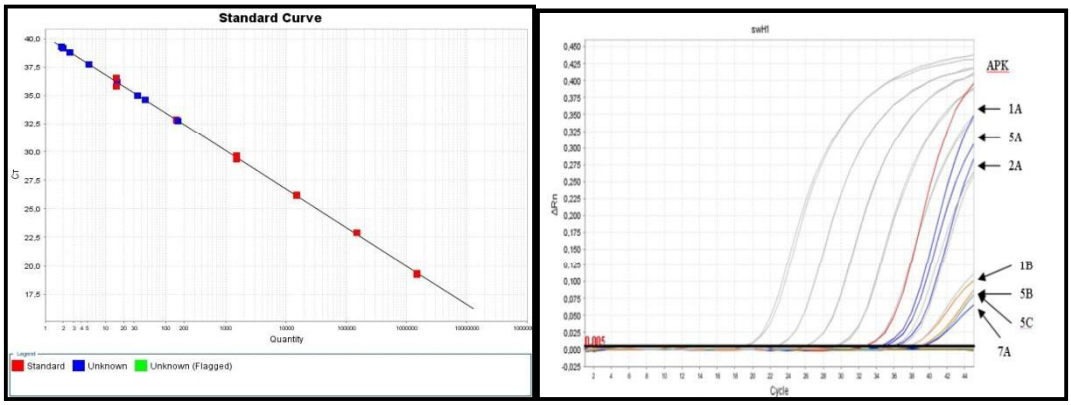
Tabell 3.2. Påvisning av influensa A(H1N1)pdm09. *Pandemisk influensavirus ble påvist med real-time ett-trinns RT PCR. Tabellen viser ct-verdiene fra sekret fra nasopharynx. Ingen tilgjengelig resultater fra pasienten 6 og 7.*

3.1.2.2 Plasmaprøver fra de hospitaliserte pasientene

Hos 4 av de 7 hospitaliserte pasientene (1, 2, 5 og 7) ble det påvist influensavirus A i plasma/serum prøvene. To av disse pasientene var positive i flere påfølgende prøver i tidsserien (pasient 1 prøve A og B samt pasient 5 prøve A, B og C). Disse var de pasientene med den kraftigste immunresponsen og det alvorligste klinisk bildet.

Resultatene fra påvisning og kvantitering er oppsummert (figur 3.2 og tabell 3.3). Mengde DNAplasmid til standardmateriale ble estimert ved bruk av spektrofotometer. Det ble utført seks replikate målinger med gjennomsnitt lik 66,3 ng/µl. Plasmid DNAet ble verifisert med influensa A(H1N1)pdm09 real-time ett-trinns RT PCR i tillegg til sekvensering med M13 forward og reverse primere. PCRen viste god effektivitet, 98,2%. Pasientprøvene ga ct-verdier fra 34,6 og oppover. Mengde influensavirus A genom i plasmaprøvene per milliliter plasma/serum prøve fra pasientene ble estimert ut ifra standardkurve av plasmidet (tabell 3.3).

For noen av pasientene ble det tatt både serum og plasma, og kvantitering vist at serum ga noe høyere verdier enn plasma, men ettersom serumprøver ikke var tilgjengelige fra alle pasientene, ble kvantiteringene sammenlignet for de positive prøvene ut fra verdier i plasma.



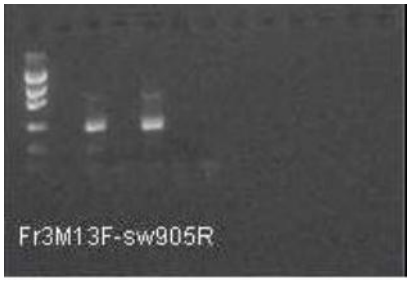
***Figur 3.2**. **Amplifiseringsplot fra tidsserien av pasientprøvene 1 – 7**. Til venstre: standardkurven (røde firkanter) for plasmid DNA fra influensa A(H1N1)pdm09 real-time RT PCR. Pasientprøvene(blå firkanter) gir ct-verdier fra 34,6 (1A), hvor alle gir høyere ct-verdi enn APK (analyse positiv kontroll). Til høyre: lineært amplifikasjonsplot. Pasientprøvene 1A og B, 2A, 5A, B og C i tillegg til 7A gir amplifikasjonskurver. Standardkurven vises i grått.*

Pasient	Influensavirus genomer per ml plasma i tidsserien		
	prøve A	prøve B	prøve C
1	2300	260	
2	790		
3			
4			
5	1800	130	100
6			
7	<100		

Tabell 3.3. Mengde influensavirus genomer per ml plasma. *Influensavirus A ble estimert ut ifra plasmid standardkurve. Hos 4 av de 7 hospitaliserte pasientene ble det påvist influensavirus A. Hos to av pasientene, 1 og 5, ble influensavirus påvist i flere påfølgende prøver i tidsserien A, B og C.*

3.1.3 Sekvensering av posisjon 222 i HA

Produkt fra PCR amplifikasjon i HA genet rundt posisjon 222 ga synlige bånd i elektroforese for plasma/serumprøver fra pasient 1 og 5, mens prøver fra pasientene 2 og 7 lot seg ikke amplifisere til påvisbare mengde med denne PCRen (figur 3.4). For pasient 2 og 7 ble det utført nested PCR med egenproduserte primerpar, se metodedel 2.2.4.2.2. I serumprøven fra pasient 7 ble det ikke påvist amplifikasjonsprodukt som kunne sekvenseres, og vi hadde heller ingen tilgjengelig nasopharynx prøve. Alle prøvene av sekret fra nasopharynx ellers fra pasienter med viremi ga synlige amplifikasjonsprodukter som kunne sekvenseres. For to av pasientene (1 og 5) var det forskjell i HA sekvens mellom virus amplifisert fra sekret fra nasopharynx og virus amplifisert fra blodprøve.

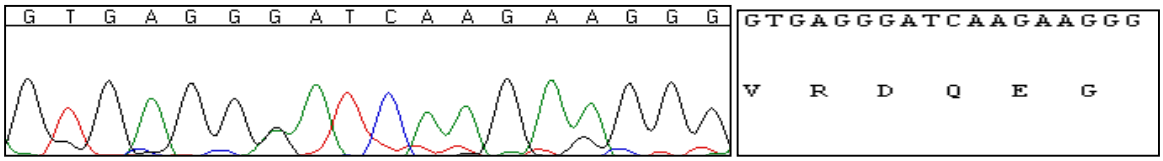


Figur 3.3. *Agarosegelelektroforese av andre PCR reaksjon (med primerene FrM13F og sw905R). Til venstre i gelen er Low DNA Mass Ladder tilsatt, deretter serum prøvene 1A, 2A og 5A, samt plasma fra 7A.1A og 5A viser tydelig sterkt bånd rett under 400 basepar som stemmer godt med aktuelt produkt på ca 380 basepar. I tillegg dannes det noen større uspesifikke amplifikasjonsprodukter.*

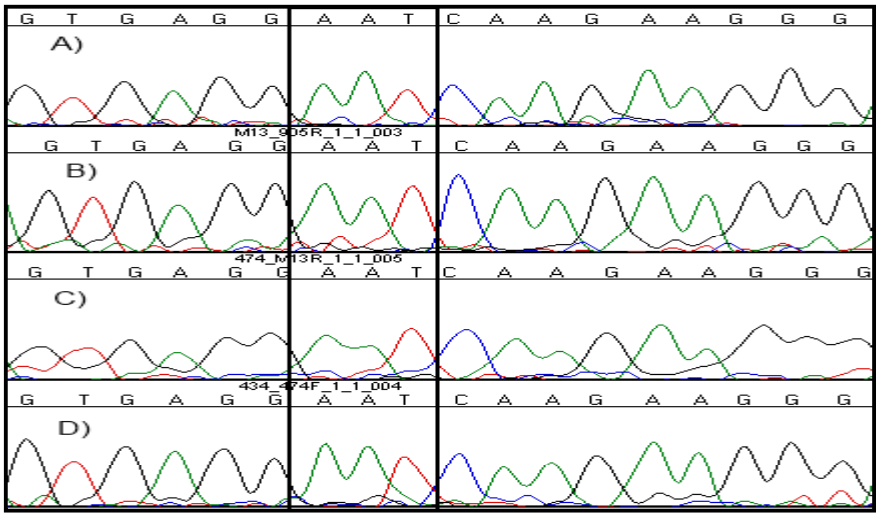
3.1.3.1 Influensavirus A sekvens fra pasient 1

HA genet fra sekret fra nasopharynx prøven hos pasient 1 viste nukleotidene GAT i posisjon 222, som koder for asparginsyre (D) (figur 3.4). For serumprøven sees nukleotidene AAT i posisjon 222 som koder for aspargin (N) (figur 3.5). Det kan likevel ut i fra kromatogrammet for sekret fra nasopharynx prøven se ut til at det er en mulig polymorfisme i første nukleotid i tripletten som gir AAT. Tripletten AAT koder for aminosyren aspargin (N) og gir dermed tilsvarende funn som i serumprøven. Prøven er tidligere genotypet til GAT (D) ved referanselaboratoriet for influensa ved Folkehelseinstituttet (FHI).

Sekvensene er lagt inn i GenBank med accession number FR796272 (serum) og FR796273 (sekret fra NX).



Figur 3.4. Kromatogram pasient 1 (sekret fra NX). *Kromatogram av sekvens fra pasient 1 (sekret fra NX), sekvensert med primer H1-474. Det er utført en nested PCR i forkant, første PCR med primerparet H1-434F og H1-1272R, andre PCR med primerparet H1-474F og H1-1272R.*



Figur 3.5 Kromatogram pasient 1 (serum). *Alignmenet av 4 sekvenser fra serumprøve 1A. A) sekvenserings primer H1-474F satt opp fra produkt med primerparet H1-474F og H1-1272R. B) sekvenserings primer H1-905R satt opp på produkt fra primerparet H1-fr3M13F og H1-905R. C) sekvenserings primer H1-fr3M13R satt opp på produkt fra H1-474F og H1-1272R. D) sekvens primer H1-474F satt opp på produkt fra H1-434F og H1-fr3M13R.*

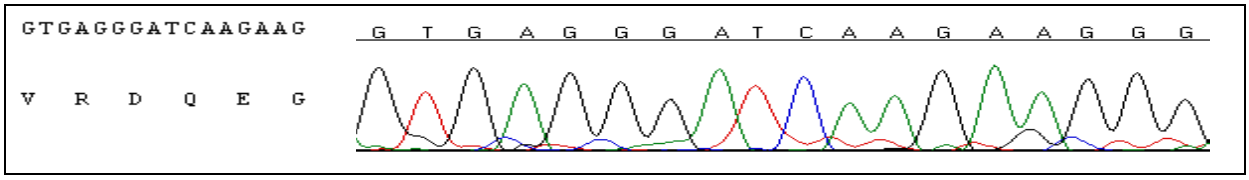
3.1.3.2 Influensavirus A sekvens fra pasient 2.

HA genet fra sekret fra nasopharynx prøven og fra serum/plasma prøven hos pasient 2 viste begge nukleotidene GAT i posisjon 222, som koder for asparginsyre (D).

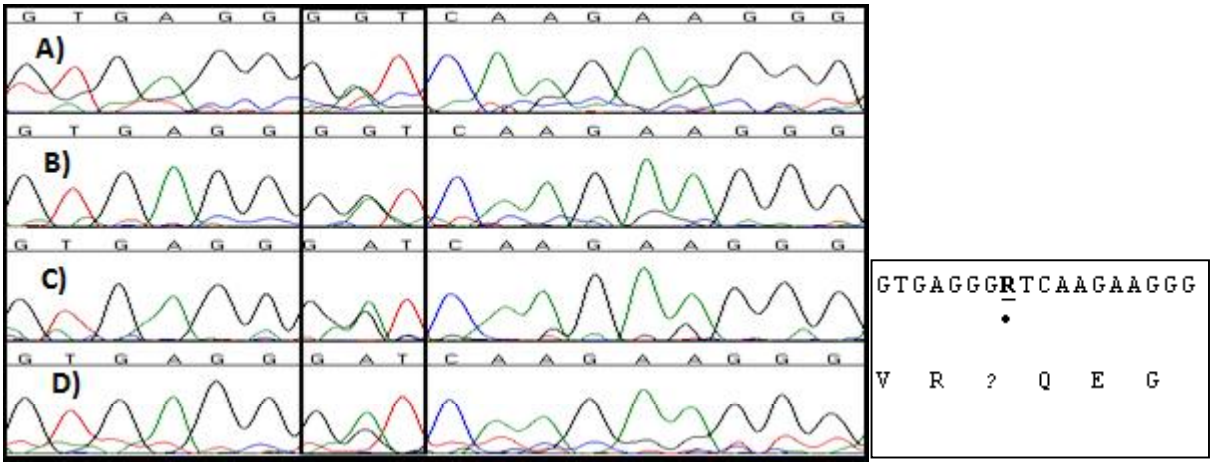
3.1.3.3 Influensavirus A sekvens fra pasient 5.

HA genet fra sekret fra nasopharynx prøven hos pasient 5 viste nukleotidene GAT i posisjon 222, mens for serumprøven sees det en polymorfisme GAT/GGT, der GGT koder for glysin (G) (figur 3.6 og 3.7).

Sekvensene er lagt inn i GenBank med accession number FR796274 (serum) og FR796275 (sekret fra NX).



Figur 3.6 Kromatogram pasient 5 (sekret fra NX). *Viser kromatogram av sekvens fra pasient 5 (sekret fra NX) sekvensert med primer H1-474. Det er utført en nested PCR i forkant, første PCR med primerparet H1-434F og H1-1272R, andre PCR med primerparet H1-474F og H1-1272R.*



Figur 3.7 Kromatogram pasient 5 (serum). *Kromatogram fra fire alignede sekvenser fra pasient 5 (serum). A) sekvenserings primer H1-fr3M13R satt opp fra produkt med primerparet H1-474F og H1-1272R. B) sekvenserings primer H1-474F satt opp fra produkt med primerparet H1-434F og H1-1272R. C) sekvenserings primer H1-474F satt opp på samme produkt som brukt i sekvens A). D) sekvenserings primer H1-fr3M13F.*

3.1.4 Oppsummering av virusresultater fra intensivpasient studien

Av de 7 pasientene med alvorlig sykdomsforløp inkludert i vår studie, hadde 4 influensavirus viremi; (pasienter 1.2,5 og 7). De to alvorligst syke pasientene (1 og 5) med sterkest immunrespons, målt ved annet laboratorium på proteinnivå, hadde høyest virus titer i plasma i tillegg til påfølgende positive prøver i tidsserien. I tillegg, hos disse pasientene ble det funnet ulike virusvarianter i posisjon 222 i plasma og fra viruset som kunne påvises i øvre luftveisprøver (sekret fra NX).

Tabell 3.4. Oppsummering av virusresultater fra intensivpasient studien. *Viser en oppsummering av påvisning av influensavirus A i sekret fra nasopharynx, kvantiterings resultatene i serum/plasma samt resultater fra sekvensering av posisjon 222 i HA.*

Pasient	A(H1N1)pdm09 real-time ett-trinns RT PCR (ct) Prøvemateriale: secret fra NX	Viremi[a] Prøvemateriale: plasmaprøver fra tidsserien			sekvensering posisjon 222 i HA	
		prøve A	prøve B	prøve C	Sekret fra NX	plasma/serum
1	25,8	2300	260		D(/N)[c]	N
2	31,6	790			D	D
3	35,4					
4	38,2					
5	25	1800	130	100	D	D/G
6	b					
7	b	<100				

a: influensavirusgenomer per ml plasma

b: foreligger ingen tilgjengelige resultater

c: kromatogram kan være forenlig med en polymorfisme, men prøve sekvensert til 222D ved referanselaboratoriet ved FHI.

3.3 Resultater stimuleringsforsøket

3.3.1 Pilotundersøkelse

Resultatene fra pilotstudiet er basert på isolert RNA fra fullblod fra 2 friske givere og virusisolat H1N1 pandemisk (A/California/7/09) med D i posisjon 222 benyttet til stimulering.

3.3.1.1. Prøvers egnethet med ulike antikoagulans: EDTA versus Lepirudin

RNA ekstrahert fra blod tappet på EDTA-rør og Lepirudin-rør ga samme utbytte, samme 260/280 ratio og renheten var tilsvarende for begge typer prøve (tabell 3.5). Differensialtelling mellom de to typer prøve ga også samme cellefordeling.

Ved real time PCR analyse på housekeeping gener (beta-ACTIN og GAPDH), ble det også funnet tilsvarende resultater, uavnhengig av hvilke antikoagulans som var brukt (tabell 3.6).

Tabell 3.5. *Spektrofotometrisk måling av prøve tappet på EDTA-rør og Lepirudin-rør.*

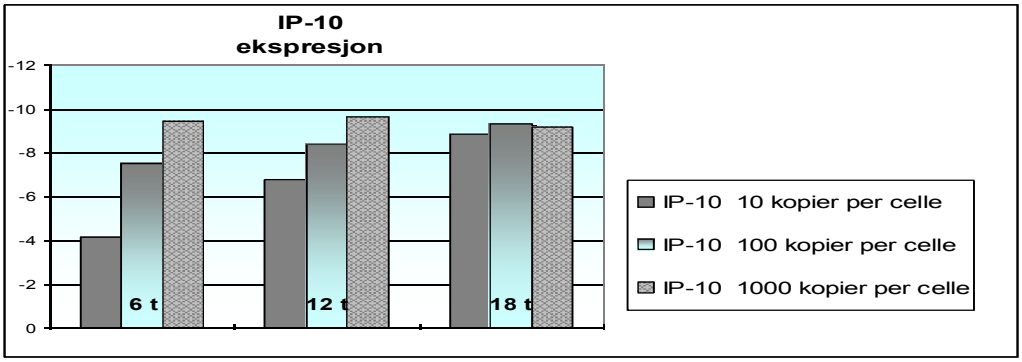
antikoagulans	260/280	260/230	ng/µl
EDTA	1,856	2,03	74,22
Lepirudin	1,848	2,05	73,91

Tabell 3.6. *Ct verdier for beta-ACTIN og GAPDH for prøve tappet på EDTA-rør og Lepirudin-rør.*

	antikoagulans	
	EDTA-rør	Lepirudin-rør
beta-ACTIN (ct)	18,87	18,97
	18,92	18,92
	18,88	18,9
GAPDH (ct)	20,91	20,96
	20,94	20,89
	20,93	20,97

3.3.1.2. Viruskonsentrasjon og inkubasjonstider.

IP-10 var det kraftigst oppregulerte genet i pilotforsøket, og ut ifra dette genet så det ikke ut som om responsen økte med mengde virus fra 10 til 1000 viruskopier per celle etter 18 timers inkubering (figur 3.8). På de ulike tidspunktene så genutrykket ut til å variere for ulike gener, mellom tidlig tidspunkt (1 time) og 18 timer.



Figur 3. 8. IP-10 ekspresjon. *Ekspresjon av IP-10 ved ulike viruskonsentrasjoner inkubert i 6, 12 og 18 timer. X-aksen viser ΔΔct-verdier beregnet mot RPS13 og negativ kontroll (mock).*

3.3.1.3 Fullblod versus buffycoat

Genuttrykk av de ulike genene på parpøver EDTAblod/buffycoat med samme virus og tidsbetingelse ga i hovedsak sammenfallende resultater (tabell 3.7). Buffycoat prøvene var tidskrevende å preparere og var vanskelig å håndtere i inkubasjonsforsøk pga konsistens.

Tabell 3.7. **Fullblod versus buffycoat**. *Delta ct- verdi for ulike gener fra fullblod og buffycoat tappet av samme giver stimulert med 1000 viruskopier per celle og inkubert i 1 time.*

	IL-1	TIMP1	IL-6	IL-10	IL-17	MMP8
fullblod	-3,43	-1,12	5,12	7,08	15,1	7,89
Buffycoat	-3,53	-0,92	5,99	8,39	15,76	7,45

3.3.1.4 Konklusjon fra pilotundersøkelsen

Følgende betingelser ble valgt etter pilotundersøkelsene: Lepidruin antikoagulens, ingen buffycoat preparering for prøvene, to tidspunkt (1 og 18 timer) og 10 viruskopier per celle.

På grunn av lav titer i cellekultur for 222G-H1N1pdm viruset, var det likevel ikke mulig å få 10 influensavirus genomkopier per celle, og hovedforsøket ble derfor gjennomført med 1 viruskopi per celle.

3.3.2 Stimuleringsforsøk- hovedforsøket

3.3.2.1 Cellepopulasjonsfordeling i blodprøvene fra giverne

Differensialtelling viste at antall celler varierte fra 4,6 til 10,33 10*9/L blod, og det var særlig mengde nøytofile granulocytter, men også leukocytter som varierte mellom de ulike giverne. Nøytrofile granulocytter har et referanseområde (partikkelkonsentrasjon) mellom 1,8 – 7,0 $x10^9$/L, leukocytter (hvite blodceller) 4,0 – 11,0 $*10^9$/L (tabell 3.9).

Tabell 3.9. Cellepopulasjonsfordeling av de 6 giverne.

	Leukocytter (10*9/L)	Nøytrofile granulocytter (10*9/L)	Lymfocytter (10*9/L)	Monocytter (10*9/L)	Eosinofile granulocytter (10*9/L)	Basofile granulocytter (10*9/L)
Giver 1	10,33	5,67	3,74	0,63	0,25	0,04
Giver 2	6,48	3,56	2,15	0,64	0,1	0,03
Giver 3	9,3	4,5	3,9	0,68	0,17	0,05
Giver 4	4,6	2,07	1,81	0,58	0,12	0,02
Giver 5	6,3	3,06	2,44	0,58	0,14	0,08
Giver 6	5,39	2,78	2,07	0,45	0,06	0,03

3.3.2.2 Måling av influensavirus A spesifikke antistoffer hos giverne ved HI test (utført eksternt ved Veterinærinstituttet)

To av de seks giverne hadde høye titer mot influensa A(H1N1)pdm09 (tabell 3.10).Titer mot sesong influensavirus ble ikke målt pga for lite virusmateriale til slikt forsøk Siden viruset sluttet å sirkulere 2 år forut for forsøket, ble ikke dette ansett som like viktig som titer mot pandemiviruset.

HI test serum	
	titer
Giver 1	1:320
Giver 2	1:40
Giver 3	1:20
Giver 4	1:20
Giver 5	1:640/1280
Giver 6	1:80

Tabell 3.10. Antistoff mot A/Cal/7/2009. *Titer anses som positivt hvis det er over 40.*

3.3.2.3 Genekspresjon

Av de 10 genene som ble funnet signifikant forskjellig fra kontroll var 8 av disse relatert til inkubasjon med 222G H1N1pdm virus. 5 av disse genen, IL-1 og IL-18 med p-verdier under 0,05, NLR med p-verdi under 0,1 og IL-6 med p-verdi under 0,01, er av betydning for inflammasjonsprosessen. IL-18 forblir signifikant forskjellig uttrykt i forhold til kontroll også etter 18 timer med p-verdi under 0,1. Genen TIMP1 og TIMP3, som koder for metalloproteinase-hemmere, er også signifikant forskjellig uttrykt etter inkubasjon med 222G H1N1pdm virus i 18 time i forhold til kontroll, med p-verdier henholdsvis under 0,1 og 0,05.

Tilsvarende funn som for TIMP1 og 3, ses med det T-celle assosierte genet CD4, med p-verdi under 0,1.

IP-10 er eneste genet som ikke er signifikant forskjellig uttrykt med 222G H1N1pdm virus men med 222D H1N1pdm og sesong H1N1 etter 18 timer i forhold til kontroll, med p-verdier under 0,05 (tabell 3.11).

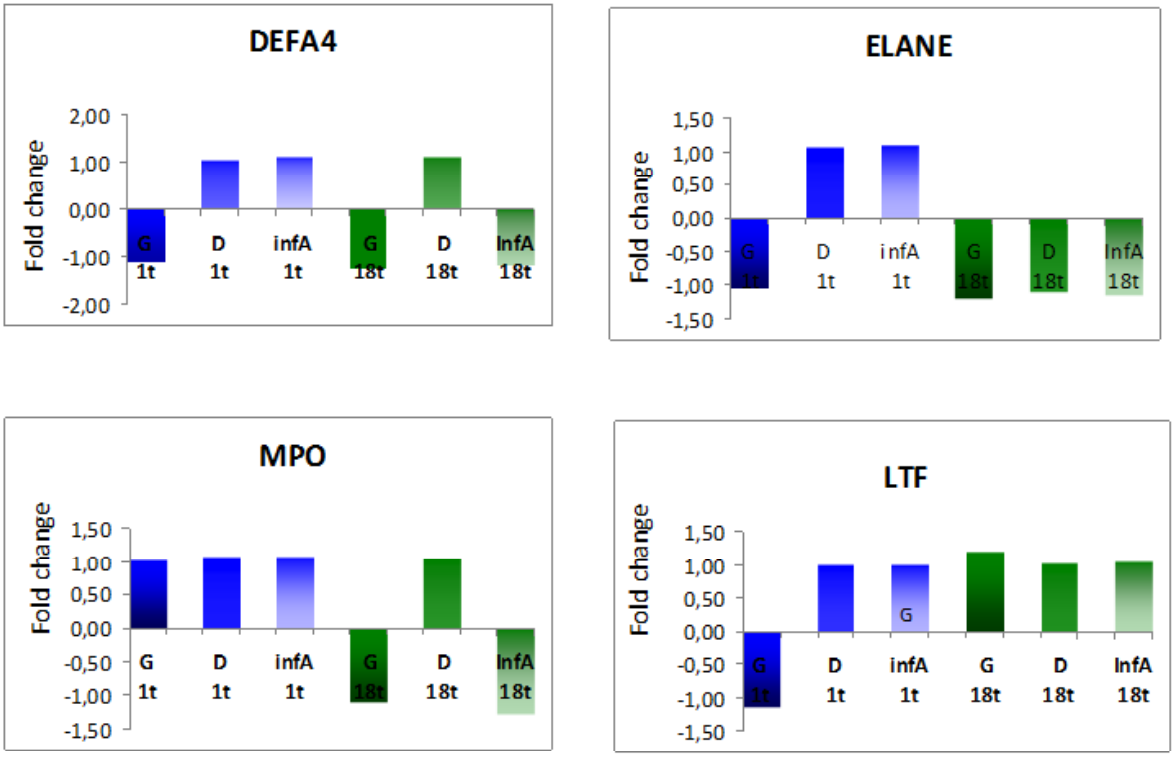
Følgende gener var signifikant forskjellig utrykt mellom 222G H1N1pdm og de andre influensavirus inkuberte cellene, IL-1, IL-6 og NLR (bare mot 222D H1N1pdm) etter 1 time, TIMP3 og IL-10 (bare mot 222Dpdm) etter 18 timer. I tillegg var IP-10 signifikant forskjellig utrykt mellom sesonginfluensa og de to H1N1pdm variantene. Disse resultatene er ikke vist i tabellen som bare viser p-verdier for virusvariantene mot negativ kontroll (mock).

Tabell 3.11. Genekspresjon, p-verdier fra t-test. *p-verdi for genekspresjon fra blodceller inkubert med ulike virusvarianter (222G, 222D, infA), mot negativ kontroll (mock), målt på to tidspunkt (1 time og 18 timer). P-verdi: *p<0,1, **p≤0,05, #p ≤ 0,01.*

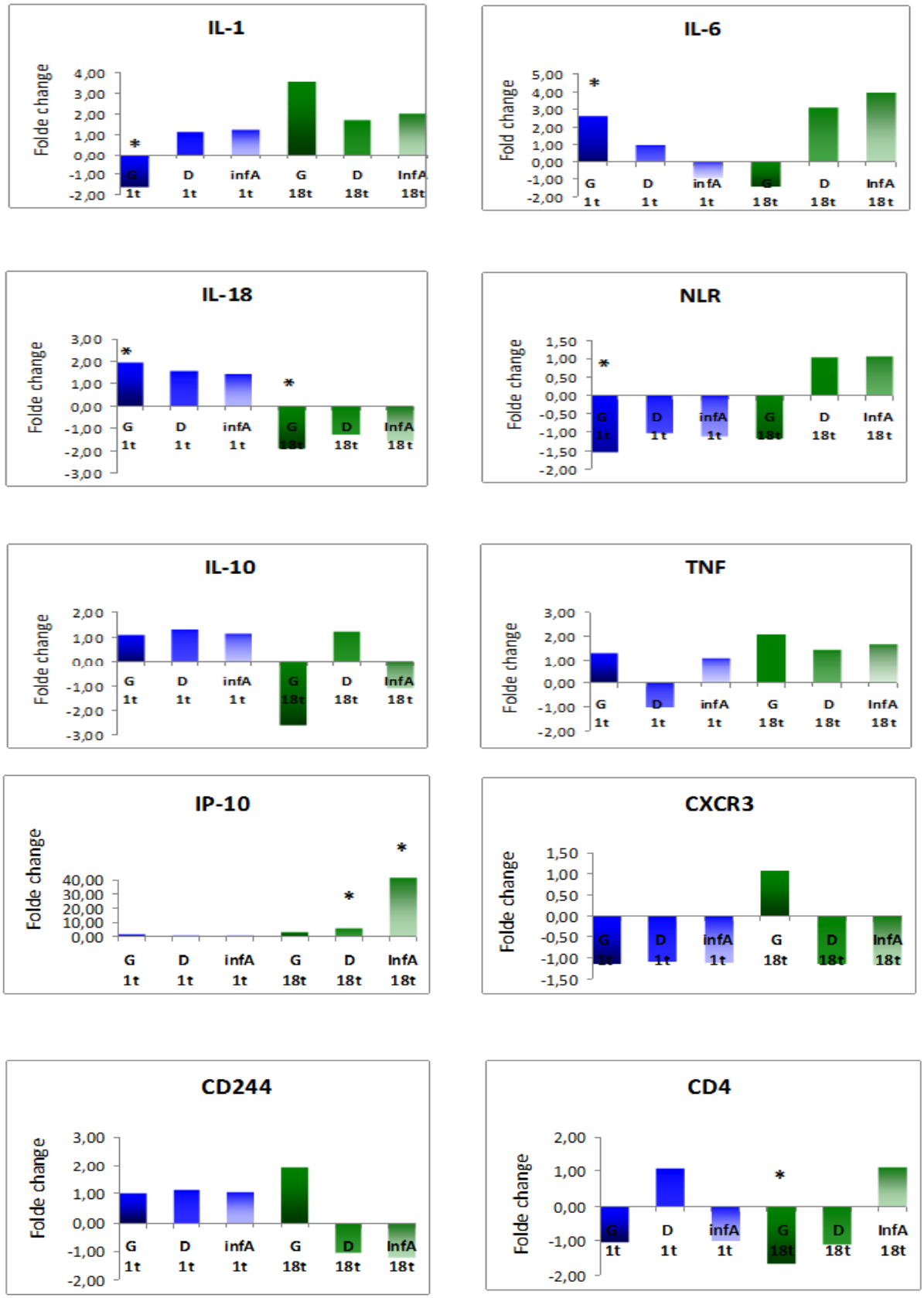
	222G	222D	infA	222G	222D	infA
	1 time			18 timer		
Granulocytt-proteiner	p-verdi					
DEFA4	0,8524	0,9363	0,8849	0,5941	0,8129	0,7196
ELANE	0,9394	0,8723	0,8651	0,6945	0,848	0,7388
MPO	0,9773	0,8488	0,8177	0,6329	0,8606	0,2077
LTF	0,8169	0,9988	0,9939	0,7135	0,9679	0,9594
Nøytrofil kollagenaser og inhibitorer						
MMP8	0,9514	0,9634	0,8272	0,6022	0,8251	0,4025
TIMP 1	0,1575	0,9283	0,8793	0,0958*	0,9871	0,1696
TIMP 3	0,3751	0,4134	0,4726	0,0119**	0,9914	0,8999
Cytokiner						
IL-1	0,0377**	0,366	0,2344	0,3078	0,7081	0,6389
IL-6	0,0052#	0,9611	0,6266	0,8501	0,596	0,5476
IL-18	0,0147**	0,2264	0,6071	0,0572*	0,3555	0,1681
NLR	0,0505*	0,9692	0,6622	0,7234	0,9326	0,8819
IL-10	0,7492	0,3904	0,6355	0,1207	0,6622	0,8537
TNF	0,3758	0,9367	0,7785	0,2434	0,6058	0,4924
Kjemokiner						
IP-10	0,1651	0,9173	0,9097	0,1763	0,0034#	0,0004#
Kjemokinreseptor						
CXCR3	0,5432	0,7332	0,6348	0,6642	0,677	0,4231
NK-celle markør						
CD244	0,8922	0,5475	0,8137	0,1192	0,9299	0,4935
T-lymfocytter						
CD4	0,8151	0,6705	0,9673	0,0883*	0,6798	0,6797

Orange=oppregulert, gul=nedregulert

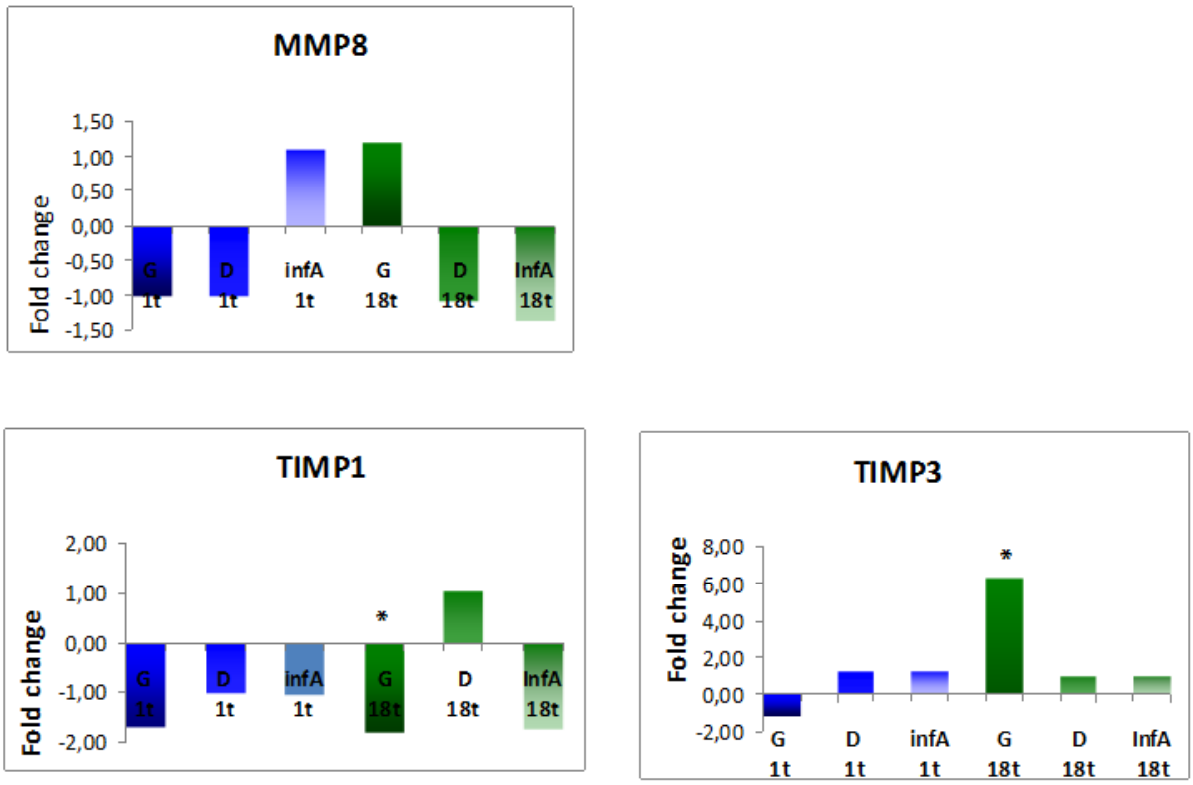
Følgende gener, etter inkubasjon med 222G H1N1pdm virus var signifikant oppregulert etter 1 time i forhold til negativ kontroll (mock), IL-6 og IL-18, og følgende gener var signifikant nedregulerte i forhold til mock , IL-1 og NLR. Etter 18 timer inkubasjon med 222Gpdm H1N1pdm virus var TIMP3 genet signifikant oppregulert mens TIMP 1, IL-18 og CD4 var signifikant nedregulert. Ingen av genene var signifikant opp- eller nedregulerte etter 1 time som følge av inkubasjon med 222D pdm eller sesong H1N1. Etter 18 timer var IP-10 signifikant oppregulert for cellene inkubert med 222D H1N1pdm og sesong H1N1, men ikke med 222G H1N1pdm (figur 3.9, 3.10 og 3.11).



Figur 3.9 Histogram fra genekspresjonresultater fra genene for granulocytt-proteinene, DEFA4, ELANE, MPO og LTF. *Fullblod ble stimulert med tre ulike influensavirus isolater 222G H1N1pdm (G), 222D H1N1pdm (D) og sesong H1N1(infA) ved to ulike tidspunkt 1 time (1t) og 18 timer (18t).*



Figur 3.9 Histogram fra genekspresjonresultater fra genen for de utvalgte cytokiner, kjemokiner samt CD244 og CD4. *Fullblod ble stimulert med tre ulike influensavirus isolater 222G H1N1pdm (G), 222D H1N1pdm (D) og sesong H1N1(infA) ved to ulike tidspunkt 1 time (1t) og 18 timer (18t). * signifikante forskjeller fra kontroll.*



Figur 3.10 Histogram fra genekspresjonresultatene fra genen for nøytrofil kollagenaser og inhibitorer. *Fullblod ble stimulert med tre ulike influensavirus isolater 222G H1N1pdm (G), 222D H1N1pdm (D) og sesong H1N1(infA) ved to ulike tidspunkt 1 time (1t) og 18 timer (18t). * signifikante forskjeller fra kontroll.*

4 Diskusjon

I denne studien har vi vist at viremi var vanlig forekommende hos pasienter med alvorlig influensa sykdom. Studiet bekrefter også betydningen av aminosyre i posisjon 222 i HA genet for patogenesen. To av de fire viremiske pasientene hadde en variant i denne posisjonen i viruset funnet i plasma i forhold til virus funnet i deres øvre luftveier. Disse to pasientene hadde også alvorligste sykdomsbilde med en kraftigere immunrespons enn de andre pasientene (Berdal *et al* 2011). Vi studerte derfor om 222G variantene i seg selv kunne påvirke immunceller og fremme en kraftigere cytokin respons.Våre *in vitro* oppfølgingsforsøk viste at 222G *per se* påvirket spesielt uttrykk av gener involvert i inflammasomet.

Influensapandemier opptrer ganske sjeldent, med forrige tilfelle i 1968, og lite er derfor kjent fra før om virus/vertsfaktorer av betydning for den endrede morbiditet og mortalitet observert ved pandemier i forhold til sesonginfluensa. H1N1 2009 pandemien spredde seg raskere enn noen av de andre influensavirus pandemiene. Grunnet effektiv spredning av viruset blant mennesker økte bekymringen for omfanget av antall syke og alvorlige tilfeller. Influensa A(H1N1)pdm09 var en helt ny reassortant satt sammen av segmenter opprinnelig fra svin, fugl og menneske, som det kun var begrenset immunitet mot i befolkningen. Til tross for dette ble det ikke observert signifikante forskjell i dødelighet sammenlignet med årlige sesonginfluensa (Donaldson *et al*., 2009). Derimot ble det registrert en forskjell i fordelingen av alder hos alvorlig syke. Yngre mennesker med ingen kjente alvorlige lidelser viste en høyere grad av dødelighet enn eldre sammenlignet med sesonginfluensa (Donaldson *et al*., 2009). Flere senere studier har sett på sammenhengen mellom kliniske og virologiske faktorer samt immunologiske parametre hos alvorlig syke pasienter. Nedsatt evne til å redusere mengde virus, aktivering av cytokiner/kjemokiner samt lavt IgG2 nivå ser ut til å være assosiert med komplikasjoner i sykdomsforløpet ved influensa A(H1N1)pdm09 (To *et al* 2010, Østerlund *et al* 2010, Bermejo-Martin *et al* 2010, Tse *et al* Gordon *et al* 2010).

Da vår studie ble planlagt hadde ikke H1N1 viruset gitt noe stort utbrudd i Europa ennå, og lite var kjent rundt virus og vertsfaktorer. Ved sekvensering av prøver samlet høsten 2009 i Norge, som ledd i influensaovervåking ved FHI, ble det vist en assosiasjon mellom mutasjonen D222G (D225G i H3 nummerering) i HA og alvorlig klinisk forløp (Kilander *et al*., 2009). Denne assosiasjon er senere blitt bekreftet i andre senere studier (Chutinimitkul *et al*., 2010, Baldanti *et al*., 2010). De to pasientene (1 og 5) som inngår i vår studie, var også inkludert i Kilander *et al* 2009 publikasjonen. Sistnevnte studie baserer seg hovedsakelig på

prøver fra øvre luftveier tilsendt FHI rutinemessig i overvåkings-sammenheng. De to Ahus pasientene ble sendt FHI og til tross for alvorlig forløp ble de karakterisert som 222D varianter i Kilander studien.

Et av hovedfunnene i vår studie er funnet av viremi hos over halvparten av pasientene med alvorlig pandemiinfluensa, samt funnet av virusvarianter i blodet, som skilte seg fra virusvarianten funnet i øvre luftveiene hos samme pasient. Viremi er sjeldent observert ved sesong influensa. Hos de alvorligst syke finner vi også en persisterende viremi over tid som kan indikere en forsinket virus eliminasjon og dermed en vedvarende aktivering av immunresponsen. Viruset som sirkulerer i blodet er antagelig likt varianter som finnes i nedre luftveier, og vår studie bekrefter derfor betydningen av aminosyre i posisjon 222 for patogenesen.

En nyere studie viser også at viremi hos pasienter med influensa A (H1N1)pdm09 er assosiert med sykdommens alvorlighetsgrad og utskillelse av cytokiner (Almansa *et al*., 2011).

G-varianten i posisjon 222 i HA genet ser ut til å påvirke reseptor spesifisitet til H1N1 viuset, mot en sterkere affinitet for alfa-(2,3) sialinsyre-galaktose reseptorer, som hos mennesker forekommer i nedre luftveiene, slikt at viruset får en mer ”fugle”lik reseptor binding (se pkt 1.6.3.3), noe som kan forklare den virale pneumonien.

I de tidligere pandemiene som har rammet menneskeheten på det 20 århundre, var HA genet overført fra fugl, og disse hadde dermed også i utgangspunktet en høyere affinitet for de fugle-spesifikke reseptorer enn de senere menneskeadapterte variantene. Disse pandemivirusenes evne til å smitte i de nedre luftveier hos mennesker synes derfor å være assosiert med sykdomsbilde som observeres ved pandemi. Et mildere sykdomsbilde ses ved senere infeksjoner med samme viruset som sesonginfluensa. Viruset er da bedre adaptert til å replikere effektivt og til å skille ut store mengder virus i øvre luftveier hos mennesker, og mister samtidig evne til å replikere like effektivt i de nedre luftveiene.

Påvisning av viralt RNA i blodet ved alvorlig sykdom med H1N1 pdm kan dermed reflektere omfattende lungeskade med fagocytterende opptak av virus-infiserte celler eller via infeksjon av monocytt og makrofager (Østerlund *et al*., 2010). På grunn av pasientenes lungeskader ble det heller ikke mulig med innhenting av bronchial alveolær lavage (BAL) prøve og funnene i blodet var derfor viktige i forhold til virusinfeksjonen i nedre luftveiene.

I vår studie, ble det funnet en polymorfisme med 222G/D for den ene pasienten, mens den andre kun hadde 222N i blodet. Senere karakterisering av virusvarianter som ga alvorlig

infeksjonsforløp, også i sesong 2010/2011, viser at 222G virus kun sjeldent smitter alene, men oftest i kombinasjon med 222D (ESWI, Malta 2011, poster).

Dette kan muligens tilskrives replikasjonsegenskaper for denne varianten, som lettest smitter og opprettholdes når 222D også er tilstede. Fra øvre luftveisprøver fra pasienten i vår studie var det ikke mulig å påvise 222G varianten, i motsetning til viremivarianten, og dette kan tyde på en spontanmutasjon av viruset hos pasienten under replikasjon, og spredning av 222G varianten i nedre luftveier. Pasientene i den norske første overvåkingsstudien (Kilander *et al* 2010) som hadde 222G var ikke i nær epidemiologisk link til hverandre. Dette kan styrke videre hypotesen om at viruset muterte *de novo* hos enkelte pasienter til varianter med større patogenesitet. Det kan likevel ikke utelukkes at virus quasispecies, med blanding av varianter i posisjon 222 er blitt overført fra menneske til menneske, og at de variantene som kom inn hos de nysmittede fordelte seg preferensielt etter reseptor affinitet.,

I vår studie ble kun et lite antall pasienter inkludert, og det ble ikke mulig å sammenligne med en gruppe pasienter med mildere sykdom, noe som er begrensende for studien. Undersøkelse av influensavirus og cytokiner, og andre immunresponsmarkører i prøvemateriale fra nedre luftveier hadde vært meget interessant i dette studiet. Innsamling av den type prøvemateriale var likevel ikke mulig fra de syv intensivpasientene, og blodprøver var derfor de mest adekvate å bruke i studien.

Pasientene viste en kraftig aktivering av det medfødte immunforsvar og da spesielt gener knyttet til aktivering av nøytrofile leukocytter. Det ble ikke funnet noen klar sammenheng mellom genuttrykk og mengde protein målt for flere av inflammasjonsproteinene. Dette tyder på at inflammasjonsrespons ikke skjedde primært i blodet men i det angrepne vevet. Det er nylig blitt publisert flere studier som har karakterisert transkripsjon fra blodcellene ved infeksjonssykdommer, og funnet spesifikke signaturer for spesifikke infeksjoner, noe som i fremtiden kan bli brukt som supplerende diagnostisk testing for oppklaring av infeksjonssykdommer (Ramilo *et al*., 2007). Spesielt fant vi sterk forhøyet inflammasjonsrespons hos de pasientene som hadde viremi med G eller 222N virus. I tillegg hadde de intensivpasientene, på mikromatrisedata lavere uttrykksnivåer av T celler markører, slikt som CD2 og CD4, samt HLA klasse II markører , noe som kan tyde på en svekket adaptiv immunrespons ved alvorlig sykdom med influensa pandemivirus. Dette er også vist i en annen tilsvarende studie (Bermejo *et al*.,2010)

***In vitro* forsøkene** ble utført på fullblod for å kunne studere den direkte stimuleringseffekten av ulike H1N1 virusvarianter på leukocytter. Stimuleringstudier er tidligere utført på pneumocyter eller makrofager, der viruset replikerer, og disse typer studier vil derfor ikke kunne sammenlignes direkte. Vi målte mengde virus etter 18 timers inkubering vha real-time kvantiteringsassay i pilotstudien, og fant ingen forhøyning av virusmengde i blodet etter inkubasjon, hvilket tyder på at influensaviruset ikke replikerte i blodcellene i vårt studie oppsett. 222Dpdm variant ble brukt i pilotstudie, og det kan derfor ikke utelukkes at 222Gpdm varianten eventuelt replikerer i monocytter eller NK celler siden det ikke ble foretatt noen kvantitering av influensavirus etter hovedstimuleringsforsøket.

Siden mRNA uttrykk er transient, og mRNA er ustabilt, vil tidspunkt for målingene være av kritisk betydning. Det er derfor mulig at direkte cytokinmåling på proteinnivå ville gitt et bedre bilde på interaksjonen mellom virus og vert i vår studie. Måling av proteinnivå ville krevd en inaktivering av viruset, av biosikkerhetsgrunner, uten at dette påvirket proteinene en ønsket å måle. Triton X er blitt vist å inaktivere influensavirus, noe som kunne vært egnet i våre forsøk, men dette hadde krevd store valideringer av så vel antiviral effekt, og mulig effekt på cytokiner og proteiner som skulle måles. Genuttrykksstudier ble derfor valgt, og to tidspunkt, tidlig og sent ble valgt, for best karakterisering av responsen.

Viruset skulle tilsettes så fort som mulig etter at blodet var tappet fra giverne, derfor ble ikke resultatene fra differensialtelling for hver giver brukt som utgangspunkt ved tilsetting av virus. Mengde virus som ble tilsatt tok utgangspunkt i estimert mengde leukocytter, ut i fra et tallsnitt for det volumet blod som ble tappet. Differensialtelling av giverne viste en del variasjon mellom de hvite subpopulasjonene selv om alle leukocyttnivåene var innenfor normal området. Antall monocytter, som produserer de fleste interleukinene, varierte imidlertid lite mellom de ulike giverne. Makrofager/monocytter har i forsøk vist seg å være spesielt viktig i den proinflammatoriske responsen (Bermejo *et al* 2010), og det er usikkert hvilken betydning ulik mengde hvite subpopulasjoner har for resultatet i stimuleringsforsøket, men virusmengde ble lavere per celle for noen av giverne.

Under oppdyrking av de ulike virusvariantene ved FHI, viste det seg at 222Gpdm varianten var vanskelig å oppformere i større mengder, selv om flere isolater ble forsøkt. I våre forsøk var det viktig å tilsette samme mengde viruspartikler til cellene, målt i genomkopier, for å kunne sammenligne effekt mellom de ulike virus variantene. Mengde 222Gpdm variant virus per milliliter cellesupernatant ble en begrensende faktor, da det ikke ble mulig å tilsette den mengde virus (10 virusgenomer) per celle en hadde konkludert med i forhold til resultatene

fra pilotstudien, som var utført med 222D variant. Viruskonsentrasjon måtte justeres ned til 1 virusgenom per celle, og dette kan ha vært for lite til å observere signifikante effekter av virus på cellenes genuttrykk. Dette kan være årsaken til at enkelte resultater fra pilotstudiet ikke lot seg reprodusere i hovedstudiet, spesielt for IL-10 og IL-17 genene.

I hovedstimuleringsstudiet var det genuttrykk på flere gener fra 222Gpdm virus stimulerte celler som skilte seg fra kontrollen, i motsetning til celler stimulerte med de andre influensavirusene.

222Gpdm varianten skilte seg da spesielt ut fra de to andre variantene i evne til å påvirke uttrykk av gener involvert i inflammasomet (IL-1, IL-6, IL-18, NLR), samt andre gener som CD4, TIMP1 og TIMP3. Til gjengjeld, mens influensavirus er kjent for å oppregulere uttrykk av IP-10 ved infeksjon, skilte ikke IP-10 nivå for 222Gpdm seg fra kontrollene. Derimot var IP-10 uttrykk signifikant forhøyet for både 222Dpdm og for sesonginfluensvarianten sammenlignet med både kontrollene og 222Gpdm stimulerte celler.

IL-1, IL-6 og IL-18 er proinflammatoriske cytokiner som skilles ut fra makrofager og monocytter. Dette er immunsignalstoffene som befinner seg midt i kjernen av inflammasomet og som er en del av det medfødte immunforsvaret. Det medfødte immunforsvaret er førsterekke forsvaret ved infeksjoner. Den består av humoral og cellulære forsvarsmekanismer, som komplementproteiner, akutt fase reaktanter, cytokiner, naturlige dreperceller og fagocytter (granulocytter, makrofager) (Lea 2006).

Høye IL-1 nivåer aktiverer lymfocytter og er et betennelsesfremmende cytokin. IL-1 påvirker makrofager til økt produksjon av IL-6, som er sentral ved induksjon av akuttfaseresponsen, ved stimulering av hepatocytter (leverceller) til økt produksjon og utskillelse av C-reaktiv protein, mannosebindene lektin, alfa2-makroglobulin og de andre akuttfasereaktantene. (Lea 2006). Hos mennesker induserer IL-6 feber, frysninger og tretthet (Weber *et al*.,1993).

I vår studiet var mRNA uttrykk for IL-6 oppregulert i forhold til kontrollene i celler stimulert med 222Gpdm virusvariant etter 1 time, mens IL-18 var oppregulert etter 1 time og nedregulert etter 18 timer. IL-6 er blitt vist til å gi sterk/overdreven vevs inflammasjon og dysregulering av immunresponsen mot influensavirus A (Lee *et al*., 2009), og det er blitt vist at en 10-folds økning av IL-6 var assosiert med over 10 ganger høyere risiko for intensivbehandling ved influensasykdom (Lee *et al*., 2011, To *et al*., 2010).

I vårt studie viser mikromatrise dataene fra pasient 1 og 5 en oppregulering av IL-18 ved første måling. Dette er sammenfallende med stimuleringsforsøket med oppregulering av IL-18

etter stimulering med 222G i forhold til kontrollene etter 1 time. Derimot ble IL-18 nedregulert etter 18 timer, noe som kan være en respons på en kaskade av tidlig responser vi ikke har målt, siden vi kun selekterer et begrenset antall gener til *in vitro* stimuleringsforsøket.

mRNA uttrykk for IL-1 derimot var nedregulert i forhold til kontroll i celler stimulert med 222Gpdm etter 1 time. IL-1 ble også undersøkt i pilotstudiet men ga ikke forandringer i delta delta ct lik ±3.

Fra intensivpasientstudie kunne vi se fra mikromatrise dataene at det var en lav mengde IL-1 mRNA hos de to pasientene med høy viremi med virusvariant. En sammenligning er allikevel vanskelig fordi i *in vivo* studier er alle kroppens organer involvert, i forhold til *in vitro* studier, på en begrenset cellepopulasjon, uten vekst/replikasjon av virus slik som i vårt tilfelle.

To av giverne hadde høye titer av antistoff mot influensa A/Cal/07/09, noe som kan tyde på mulig nylig gjennomgått infeksjon med pandemi-lignende virus. Flere av giverne ellers hadde lave antistoff nivåer, men det vil være vanskelig å finne givere uten målbare antistoffer mot influensavirus. Giverne ble selektert på bakgrunn av at de ikke skulle være vaksinerte siste året mot influensa, ei heller vært syke med influensalignende sykdommer på minst ett år. Det kan ikke utelukkes at eventuell relativ nylig smitte med H1N1 var subklinisk for de to giverne med høyest titre. Siden antistoff nøytraliserer viruset kan det bli for lite frie viruspartikler til å stimulere cellene. Til gjengjeld kan antistoffer bundet til antigen trigge en annen respons enn ellers. For å ta høyde for disse forhold ble resultatene regnet både med og uten dataene fra de to giverne med høyest antistoff titer. Etter fjerning av tallmateriale fra disse giverne ble funnene med signifikante forskjellene mot kontrollen lik med unntak av for IL-1 og NLR. Det er mulig den høye tilstedeværelsen av antistoff hos disse giverne er årsaken til nedregulering av disse genene og dette vil kunne tyde på at spesielt den observerte nedreguleringen av IL-1 med 222Gpdm i vårt *in vitro* forsøk ikke ville vært observert i en naiv populasjon. Tilsvarende, mRNA for NLR i celler stimulert med virusisolat-222G, var signifikant forskjellig fra kontrollen etter 1 time, hvis de to sterkt seropositive giverne var inkludert i bergeningene. NLR har en rekke funksjoner i regulering av inflammatorisk og apoptosisk respons, og fungerer som (PRR:pattern recognition receptor) som gjenkjenner fremmede organismer i cytoplasma, og dette kan dermed indikere at denne responsen settes i gang spesielt hos mennesker som har tidligere immunitet mot viruset. Betydning for en naiv populasjon, som ved første pandemibølge, er derfor usikker.

mRNA for TIMP3 var oppregulert i forhold til kontrollen etter 18 timer, mens TIMP 1 var nedregulert etter samme tid. Disse metalloproteinas-hemmerne er vevs-inhibitorer som hemmer matriks metalloproteinaser (MMP), involvert i nedbryting av proteiner som kollagen som finnes i mellomrommene mellom celler i vev (ekstracellulær-matrix). Mikromatrisedataene viste MMP-8 som en av de mest oppregulerte genene mens pasient 5 viser lav mengde TIMP2, mens det på proteinnivå ble vist at TIMP-1 og TIMP-3 var signifikant forhøyet. Det kan tenkes at en ubalanse mellom nivået av aktivert MMP og nivået av TIMP kan ha betydning for grad av vevsskade i lungene ved influensa infeksjon.

Funn fra vårt studium viste etter 18 timer en ca 5 ganger oppregulering av IP-10 i celler stimulert med 222Dpdm og ytterligere oppregulert, 40 ganger, i celler stimulert med sesongifluensa i forhold til kontrollene. Interferon gamma-indusert protein 10 (IP-10) eller CXCL10 proteinet skilles ut av monocytter, endotelceller og fibroblaster som en respons til IFN-γ (interferon-gamma). Dette proteinet fungerer som kjemoattraktant for monocytter/makrofager, T-celler, NK-celler og en rekke andre celler. Denne prosessen setter i gang en Th1 celleulære immun responsen, kjent for å være en viktig respons i bekjempelse av influensa infeksjoner (Bermejo *et al*., 2010). Pilotforsøket av IP-10 der 222Dpdm varianten ble brukt viste også en kraftig oppregulering etter 18 timer både med 10 og 1000 virusgenomkopier per ml. I vår intensivstudie, hadde de to pasientene med høy viremi og virusvaraint høyest verdier IP-10 i blodet på proteinnivå. Til gjengjeld, har andre studier på proteinnivå har vist lavere respons av IP-10 hos influensa A(H1N1)pdm09 sammenlignet med sesonginfluensa (Lee *et al*., 2011), og våre direkte stimuleringsstudier med 222Gpdm tyder på at denne virusvarianten ikke fremmer høyt uttrykk av IP-10. Diskrepans mellom vår intensivstudie og det *in vitro* stimuleringsforsøket kan skyldes både forskjeller på *in vivo* og *in vitro* parametre, protein nivå i blod kontra mRNA, samt at hos pasientene med virusvariant i blodet, var det 2 virusvarianter samdidig hos disse pasientene, slikt at høye nivåer av IP10 også kan være forårsaket av 222Dpdm varianten.

Flere pasientstudier viser at flere gener ansvarlig for det medfødte immunforsvaret og T-celle respons nedreguleres av influensa A(H1N1)pdm09, noe vår egen intensivstudie viste (Bermejo *et al*., 2010, Arankalla *et al*., 2009; berdal *et al.*, 2011). I vårt stimuleringsstudium ble det T-celle reseptor-assosierte genet, CD4, signifikant nedregulert i celler stimulert med virusisolat 222Gpdm forhold til kontrollene etter 18 timer, noe som tyder på en direkte påvirkning av denne virusvarianten på T-cellepopulasjoner av mulig betydning for sykdomsforløp.

5 Konklusjon

Vår studie viste at en influensa virusvariant var assosiert med alvorlig sykdomsforløp under 2009 pandemien, og flere av pasientene med alvorlig viral sepsis hadde viremi.
Vår *in vitro* studie viste at 222Gpdm virus varianten påvirket uttrykk av gener involvert i inflammasjonsprosess, og nedregulerte CD4 uttrykk, samt TIMP3, mens IP10 ikke ble oppregulert, i motsetning til celler stimulert med andre influensa H1N1 virus. Den observerte responsen viste at 222Gpdm viruset hadde andre egenskaper i forhold til vertsrespons enn sesong influensavirus eller 222Dpdm variant, noe som kan forklare dens assosiasjon med de alvorligste kliniske tilfeller av influensa. Dette gir oss bedre forståelse for de underliggende mekanismene for alvorlig influensa sepsis under tidlige pandemifaser, samt betydningen av samspill mellom virus og vertsresponsen for patogenisitet.

Videre arbeid vil kunne omfatte proteinmålinger som karakteriserer immunresponsen etter stimulering med influensavirus, samt videre studier på betydningen av komplement i tidlig respons mot influensa infeksjon. Optimalisering av virusmengde i forhold til stimulerte celler, samt rensing av ulike celletyper, for tydeligere karakterisering av stimulering vil kunne gi oss flere svar.

Fra intensivstudien ble det ikke mulig å inkludere flere enn 7 pasienter og heller ikke en gruppe med mild influensa A(H1N1)pdm09 infeksjon til sammenligning. Disse funnene må derfor tolkes med forsiktighet og bør konfirmeres med et større tallmateriale. Pandemier med influensavirus er ganske sjeldne, og selv om viruset fremdeles sirkulerer hos mennesker, har populasjon nå fått immunitet mot viruset, hvilket gjør det umulig å gjenskape situasjonen verden var i i 2009. Vårt materiale var derfor unik for virus/vertsinteraksjon karaterisering av naiv populasjon mot et pandemivirus i tidlig fase på klinisk materiale.

6 Litteraturliste

Almansa R, Anton A, Ramirez P, Martin-Loeches I, Banner D, Pumarola T, Xu L, Blanco J, Ran L, Lopez-Campos G, Martin-Sanchez F, et al. (2011). Direct association between pharyngeal viral secretion and host cytokine response in severe pandemic influenza. *BMC Infectious Diseases*, 11:232.

Anton A, Marcos A M, Martinez M J, Ramon S, Martinez A, Cardenosa N, Godoy P,Torner N, Molina P D, Isanta R, Jimenez de Anta M T, Pumarola T (2010). D225G mutation in the hemagglutinin protein found in 3 severe cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Spain. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease*, Volume 67, Issue 2, 207-208.

Arankalle VA, Lole KS, Arya RP, Tripathy AS, Ramdasi AY, Chadha MS, et al. (2010). Role of host immune response and viral load in the differtial outcome of pandemic H1N1(2009) influenza virus infection in Indian patients. *PloS One*;5(10).

Berdal JE, Mollnes TE, Wæhre T, Olstad OK, Halvorsen B, Ueland T, Kaake JH, Furuseth MT, Maagaard A, Kjekshus H, Aukrust P, Jonassen CM (2011). Excessive innate immune response and mutant D222G/N in severe A (H1N1) pandemic influenza. *J Infect.* Oct;63(4):308-16.

Boom R *et al*., (1990). Rapid and simple method for purification og nucleic acids. *Journal of clinical microbiology*, p.495-503.

Boom *et al*., (1999). Improved Silica-Guanidiniumthiocyanate DNA isolation procedure based on selective binding of bovine alpha-casein to silica particles. Journal of clinical microbiology, p.615-619.

Cheung, J. Raghwani, S. Bhatt, J. S. Peiris, Y.Guan, and A. Rambaut (2009). Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 459:1122–1125.

Cheung CY, Poon LLM, Lau AS, Luk W, Lau YL, Shortridge KF, Gordon S, Guan Y, Peiris JSM (2002). Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? *The Lancet*, Vol 360,7.

Chen G-W *et al*., (2004). Influenza A Virus PB1-F2 Gene in Recent Taiwanese Isolates. *Emerging Infectious Diseases.* Vol.10, No.4.

Chen H, Smith GJ, Zhang SY, Qin K, Wang J, Li KS, Webster RG, Peiris JS, Guan Y(2005). Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature*, 436:191-192.

Claas EC, Jong JC, Beek R (1998). Human influenza virus A/HongKong/156/97 (H5N1) infection. *Vaccine*, 16:977-978

Cox NJ, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses: Influenza. In: Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 9th ed., Collier L, Balows A., Sussman M., eds., Edward Arnold, London Vol.1, 1997: 385-433.

Chen G-W *et al*., (2004). Influenza A Virus PB1-F2 Gene in Recent Taiwanese Isolates. *Emerging Infectious Diseases*. Vol.10, No.4.

Riel D, Munster VJ, Wit E, Rimmelzwaan GF, Fouchier RAM, Osterhaus ADME, Thijs Kuiken T (2006). H5N1 Virus Attachment to Lower Respiratory Tract. *Science.* Vol.10,No.4.

Donaldson LJ, Rutter PD, Ellis BM, Greaves FE, Mytton OT, Pebody, Yardley IE (2009). Mortality frompandemic A/H1N1 2009 influenza in England:public health surveillance study. *BMJ*;339:b5213.

ESWI, Malta (2011).High prevalence of A(H1N1) 2009 viruses associated with severe outcomes expressing HA 222D/G. Robert Koch Institute, poster.

Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, *et al*.,(2004). Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*;101:1356-361.

Fouchier RA, Munster V,Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus ADME (2005). Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls. *J of virology*, p. 2814–2822.

Fouchier ESWI 2011, Malta.

Gordon CL, Johnson PDR, Permezel M, Holmes NE, Gutteridge G, McDonald CF, Eisen DP, Stewardson AJ, dington J, Charles GP, Crinis N, Black MJ, Torresi J, Grayson ML (2010). Association between Severe Pandemic 2009 Influenza A (H1N1) Virus Infection and Immunoglobulin G2 Subclass Deficiency.*Clinical Infectious Diseases*; 50:672–678.

Hungnes O, Dudman S G. Resistens hos influensavirus (2008). *Tidsskr Nor Legeforening*;128:2601-6 Nr.22-20. november 2008

Horimoto T, Kawaoka Y (2005). Influenza: lessons from past pandemic, warnings from current incidents. *Nature reviews Microbiology*, Volume: 3 Issue: 8 Pages: 591-600.

Huang, T.-S., Palese, P., Krystal, M. (1990). Determination of influenza virus proteins required for genome replication. *J. Virol*. 64, 5669– 5673).

Kilander A, Rykkvin R, Dudman SG, Hungnes O (2010). Observed association between the HA1 mutation D222G in te 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus and severe clinical outcome, Norway 2009-2010. *Euro Surveill* Mar4;15(9).

Lea T (2006). *Immunologi og immunologiske teknikker*. 3 utg. Bergen, Fagbokforlaget.

Lee N, Wong CK, Chan PKS, Chan MCW, Wong RYK, Lun SWM, Ngai KLK, et al.(2011) Cytokine Response Patterns in Severe Pandemic 2009 H1N1 and Seasonal Influenza among Hospitalized Adults. PLoS One, Volum 6, Issue 10, e26050.

Ichinohe T, Lee HK , Ogura Y, Flavell R, Iwasaki A (2009). Inflammasome recognition of influenza virusis essential for adaptive immune responses. *J. Exp. Med*. Vol. 206 No. 1 79.

NIC Influenza. 2009.Koch Robert pcr protocol: German National Reference Center for Influenza (NIC) TaqMan real-time PCR for the detection of the HA gene of newly emerging Influenza A/H1N1 viruses (swine origin). Robert Koch Institute,

Liu S, Ji1 K, Chen J, Tai1 D, Jiang W, Hou G, Chen J, Li1 J, Huang B (2009). Panorama Phylogenetic Diversity and Distribution of Type A Influenza Virus. *PLoS ONE*, Volume 4, Issue 3, e5022.

Noble S, McGregor MS, Wentworth DE, Hinshaw VS (1993). Antigenic and genetic conservation of the haemagglutinin in H1N1 swine influenza viruses. *J of General Virology 74, 1197-1200.*

Neumann G, Noda T, Kawaoka Y (2009). Emergence and pandemic potentila of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*, Vol 459, doi:10.1038.

Olofsson S, Kumlin U, Dimock K, Arnberg N (2005). Avian influenza and sialic acid receptors: more than meets the eye? *Lancet Infect Dis*;5:184-88.

Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenstro¨m J , Osterhaus ADME, Fouchier RAM (2006). Global Patterns of Influenza AVirus in Wild Birds. Review. *Science*, Vol 312

Pang IK, Iwasaki A (2011). Inflammasomes as mediators of immunity against influenza virus. *Trends in immunology*, Vol.32, No.1.

Ramilo O, Allmann W, Chung W, Mejis A, Ardura M, Glaser C, et al. (2007). Gene expression patterns in blood leukocytes discriminate patients with acute infections. *Blood*, 109(5):2066-77.

Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, *et al*. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*;7:3.

Schule M, Nitsche A, Schweiger B, Biere B. Diagnostic approach for the differention of the pandemic influenza A (H1N1)v vius from recent human influenza viruses by real-time PCR. *Plos One* 2010;5(4):e9966

Smith, G. J., D. Vijaykrishna, J. Bahl, S. J. Lycett, M. Worobey, O. G. Pybus, S. K. Ma, C. L. Cheung, J. Raghwani, S. Bhatt, J. S. Peiris, Y. Guan, and A. Rambaut. 2009. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. Nature 459:1122–1125. NB!

Shope, R.E. (1931). Swine influenza. III. Filtration experiments and etiology. *J. Exp. Med*. 54, 373±380.

Tse H, Kelvin K, To W, Wen X, Chen H, Chan KH, Tsoi HW, Li IWS, Yuen KY (2011). Clinical and Virological Factors Associated with Viremia in Pandemic Influenza A/H1N1/2009 Virus Infection. *Plos One* ;6(9):e22534.

Tønnessen R, Germundsson A, Jonassen CM, Rimstad E (2011). Hvilken betydning har influensavirus hos måker for fjørfe? Funnet på world wide web: http://umb.no/statisk/husdyrforsoksmoter/2011/106.pdf

Van Reeth K (2007). Cytokines in the pathogenesis of influenza. *Veterinary Microbiology*, 74, 109-116.

Ward CL, Dempsey MH, Ring CJA, Kempsond RE, Zhang L, Gore D, Snowdena BW. (2004).Design and performance testing of quantitative real time PCR assays for influenza A and B viral load measurement. *Journal of Clinical Virology* Vol 29, 179–188.

WHO (2009) World now at the start of 2009 influenza pandemic http://who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_pandemic_phase6_20090611/en/index.html

World Health Organization. Influenza, Available http://www.who.int/topics/ influenza/en. Accessed 2011 May, 1.

Webster R.G *et al*., (1992). Evolution and ecology of influenza A virus. *Microbiol. Mol. Biol*. Rev. 56(1):152-179.

Wright PF, Webster RG (2001). Orthomyxoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds *Fields Virology*, 4th ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins.

Wahlgren J (2011). Influenza A viruses: an ecology review. *Infection Ecology and Epidemiology*, 1: 6004 - DOI: 10.3402/iee.v1i0.6004

Webster RG, Webby RJ, Perdue M (2011). The Origin and Evolution of H1N1 Pandemic Influenza Viruses. G. Del Giudice and R. Rappuoli (eds.), Influenza Vaccines for the Future, 2nd edition, *Infectious Diseases*, DOI 10.1007/978-3-0346-0279-2_4, # Springer Basel AG 2011

Weber J, Yang JC, Topalian SL, Parkinson DR, Schwartzentruber DS, Ettinghausen SE, Gunn H, Mixon A, Kim H, Cole D (1993). Phase I trial of subcutaneous interleukin-6 in patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol* 11:499±506.

Wenjun M, Kahn RE, Rict JA (2009). The pig as a mixing vessel for influenza viruses: Human and veterinary implications. Review. J Mol Genet Med,3(1),158-166.

Østerlund P, Jaana Pirhonen J, Ikonen N, Rönkko E, Strengell M, Mäkela SM, Broman M, Hamming OJ, Hartmann R, Ziegler T, Julkunen I (2010). Pandemic H1N1 2009 Influenza A Virus Induces Weak CytokineResponses in Human Macrophages and Dendritic Cells and Is Highly Sensitive to the Antiviral Actions of Interferons. *J of Virology*, p. 1414–1422 Vol. 84, No. 3.