

VAKCINÁCIA, NAJLEPŠIA PREVENCIA VOČI CHRÍPKE

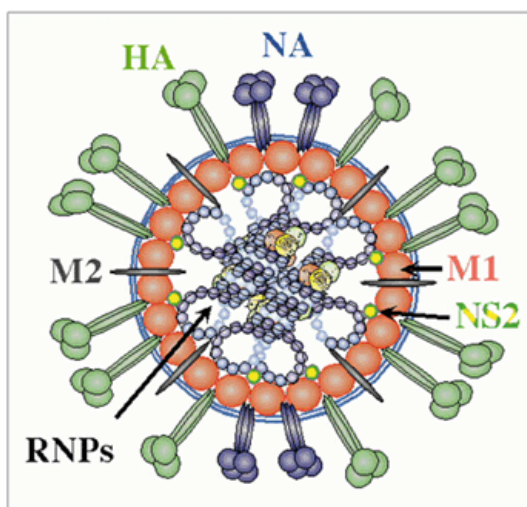
Kotlárová Lucia

Medicína a veda napreduje neskutočnou rýchlosťou. Poznatky, ktorými dnes disponujeme, môžu byť zajtra obohatené o nové skutočnosti alebo dokonca vyvrátené. Hoci je zaznamenaný progres aj na poli očkovania voči chrípke, stále sa nenašiel nikto, kto by prišiel, vyhlásil a v skutočnosti aj univerzálnu vakcínu voči chrípke zostrojil. Pojem univerzálna vakcína voči chrípke pre verejnosť znamená očkovanie raz za život (aspoň pre tú uvedomelú, ktorá vidí význam v očkovaní ako jedinej ochrane voči vírusovým patogénom), pre vedcov to však znamená pochopiť podstatu „života“ vírusu chrípky a oklamať jej únikové mechanizmy. Pritom uplynulo už 70 rokov od vyvinutia prvej vakcíny voči chrípke... (1).

Chrípka je ochorenie vyvolané vírusmi. Vírusy chrípky z taxonomického hľadiska rozdeľujeme na vírusy chrípky typu A, B a C. Tieto sú zaradené do spoločnej čeľade *Orthomyxoviridae*. Vírusy chrípky typu A infikujú vtáky a rôzne druhy cicavcov, vrátane ľudí. Vírusy typu B infikujú len ľudí, kým vírusy typu C aj ošípané. Epidémie a pandémie sú spojené práve s vírusmi typu A, voči ktorým je namierená v súčasnosti najefektívnejšia prevencia, ktorou je vakcína. Ročne podľa WHO (World Health Organization – Svetová zdravotnícka organizácia) ochore 3 až 5 miliónov ľudí na chrípku s vážnym priebehom, čo vedie nielen k 500 000 úmrtiam, ale aj k veľkým ekonomickým stratám spojeným s práceneschopnosťou pacientov. Pritom riešenie je také jednoduché: 10 minút strávených každoročne v ordinácii obvodného lekára spojených s jednou injekciou.

Z patogenetického hľadiska sú najvýznamnejšie vírusy chrípky typu A. Ich povrch je tvorený lipidovou membránou, ktorú vírusy získavajú pri pučaní z hostiteľskej bunky. Genóm vírusu chrípky typu A je tvorený ôsmimi segmentami RNA negatívnej polarita, ktoré kódujú 12 proteínov (2). Každý z nich má pre vírus chrípky špecifický význam (tab. č. 1). Prvý, najväčší segment kóduje polymerázový proteín PB2 (polymerázový zásaditý 2 – basic); druhý PB1 (polymerázový zásaditý 1), PB1-F2 (objavený v roku 2001) a N40 (objavený len v roku 2009) (3). Tretí segment kóduje PA (polymerázový kyslý - acid) proteín; štvrtý HA (hemaglutinín); piaty NP (nukleoproteín); šiesty NA (neuraminidáza). Siedmy segment nesie informáciu pre matrixový proteín M1 a M2 proteín a ôsmy pre neštruktúrny NS1 proteín a NEP (nukleárny exportný proteín) (obr. č. 1). Každý z týchto proteínov je špecifický svojou úlohou (tab. č. 1).

Obrázok č. 1: **Vírusová častica**, podľa http://www.aht.org.uk/cmsdisplay/science_eqflu.html



HA – hemaglutinín,
NA – neuraminidáza,
M1 a M2 a NS2 proteíny
RNPs – ribonukleoproteín, spoločný názov zahrňujúci RNA
s PB2, PB1, PA a NP proteínmi (popis jednotlivých
proteínov v texte).

Segment	Proteín	Funkcia
1.	PB2	Podjednotka polymerázového komplexu; Iniciácia transkripcie
2.	PB1	Podjednotka polymerázového komplexu; Viaže PB2 a PA, čím vytvára aktívny heterotrimér, nevyhnutný pre transkripciu a replikáciu vírusu
	PB1-F2	Induktor apoptózy - poškodenie mitochondrií
	N40	Funkcia zatiaľ nie je jasná (2)
3.	PA	Podjednotka polymerázového komplexu; Jej endonukleázová aktivita je zodpovedná za „ukradnutie“ čiapočky bunkovej mRNA
4.	HA	Hlavný povrchový antigén, Väzba na receptor bunky; Fúzia vírusovej a bunkovej membrány
5.	NP	Tvorba RNP; Zúčastňuje sa na prepnutí syntézy z mRNA na vírusovú RNA
6.	NA	Pomáha uvoľniť novovznikajúce virióny z infikovanej bunky a zabraňuje ich agregácii
7.	M1	Vytvára súvislú vrstvu pod lipidovým obalom, tým stabilizuje vírusovú časticu
	M2	Iónový kanál – transport H^+ iónov, okysľovaním prostredia vo vnútri vírusovej častice ovplyvňuje uvoľnenie (RNP) do cytoplazmy hostiteľskej bunky
8.	NS1	Blokuje bunkovú antivírusovú odpoveď inhibíciou polyadenylácie bunkovej pre-mRNA, je inhibítor PKR a antagonista interferónu alfa
	NEP	Sprostredkuje export novo syntetizovaných RNP z jadra

Tab. č. 1: Popis funkcie jednotlivých proteínov vírusu chrípky typu A

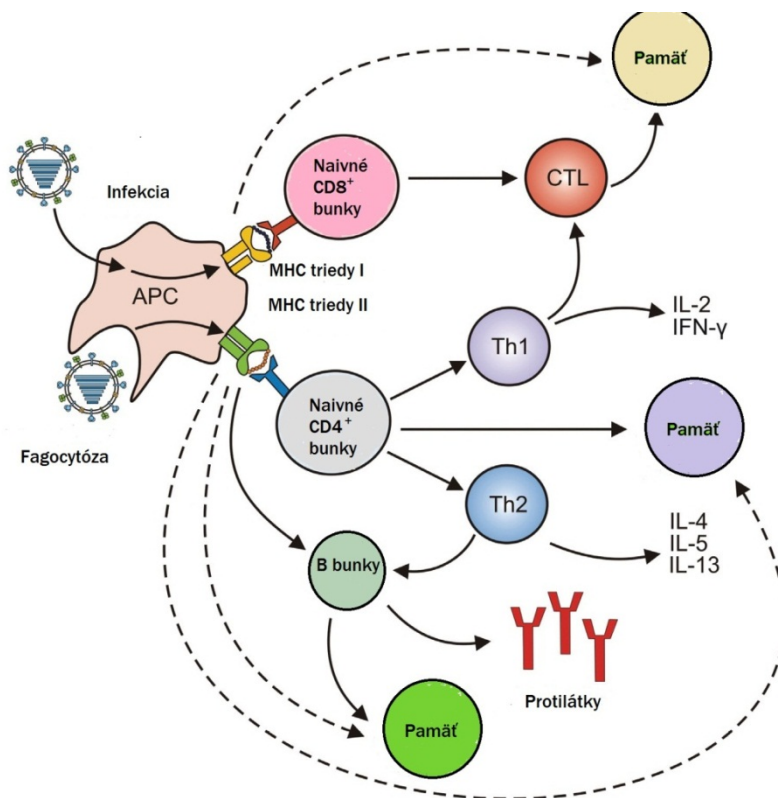
Vírusy chrípky typu A delíme na subtypy na základe antigénnych vlastností obalových glykoproteínov hemaglutinínu (HA) a neuraminidázy (NA). Z tohto hľadiska je dodnes identifikovaných 17 HA a 9 NA suptypov. U ľudí je infekcia vyvolávaná subtypmi H1, H2 alebo H3 v kombinácii s N1 alebo N2. U oboch povrchových antigénov boli popísané 2 typy antigénnych zmien: antigénny posun (antigenic drift) a antigénna výmena (antigenic shift), výsledkom ktorých je vznik epidémii, resp. pandémiei. Práve tieto antigénne zmeny sú dôvodom, prečo treba očkovanie každoročne opakovať. Súčasné používané vakcíny majú schopnosť indukovať vírus-neutralizačné protilátky namierené voči imunodominantnej časti HA v oblasti receptorového miesta. Keďže je táto oblasť vysoko variabilná, je potrebné vakcínu každú sezónu aktualizovať.

Imunitná odpoveď vyvolaná po infekcii vírusom chrípky

Jednou z úloh imunitného systému je zneškodniť a eliminovať patogény prenikajúce do organizmu. Takým patogénom je aj vírus chrípky spôsobujúci respiračné ochorenie, ktoré sa prenáša kvapôčkovou infekciou. Chrípka predstavuje vážny problém pre deti, starších ľudí a pre osoby trpiace chronickými ochoreniami (napr. srdcovo-cievne ochorenia). Imunitný systém bojuje proti patogénom vrodenu a získanou imunitnou odpoveďou, ktoré spolu úzko spolupracujú (obr. č. 2).

Vrodená imunitná odpoveď. Ak vírus chrípky prenikne do tela hostiteľa, trvá 5 až 7 dní než sa voči nemu začnú tvoriť špecifické protilátky. Práve v tieto dni je úloha vrodenej imunitnej odpovede kritická. Snaží sa zabrániť šíreniu vírusu a napomáha k rozvinutiu spomínaných špecifických protilátok (4). Medzi najdôležitejšie zložky vrodenej imunitnej odpovede patria makrofágy, dendritické bunky (DC), NK bunky (natural killers) a komplement. V prvej fáze dochádza k uvoľňovaniu cytokínov, napríklad interleukínov, interferónov (IFN) alebo TNF (5). Opodstatnenosť vrodenej imunitnej odpovede pri chrípkovej infekcii je potvrdená aj funkciou NS1 proteínu chrípky, ktorý je antagonistom IFN. Pri delcii NS1 dochádza k zvýšenej produkcii IFN a vírus je zneškodnený (6). Typické znaky pre vrozenú imunitnú odpoveď sú, že jej mechanizmy nepotrebujú čas na aktiváciu, nereagujú na základe pamäte a nie sú antigén špecifické.

Získaná imunitná odpoveď. Je výsledkom spolupráce humorálnej a bunkovej imunitnej odpovede, čo znamená účasť protilátok a špecifickej T bunkovej odpovede. Hlavným obranným mechanizmom voči chrípkovej infekcii je tvorba vírus-neutralizačných protilátok voči HA, ktoré sú však kmeňovo špecifické, preto prekonanie chrípkovej infekcie nezaručí ochranu voči inému kmeňu vírusu chrípky. Hoci vírus neutralizačné protilátky nezabezpečia heterosubtypovú imunitu, ich význam spočíva v tom, že ako jediné dokážu vírus na seba naviazať a tým zabrániť jeho infekčnosti. Významnú úlohu zohrávajú aj zložky bunkovej imunitnej odpovede ako cytotoxické lymfocyty (CTLs), ktoré sa podieľajú pri navodení heterosubtypovej imunity a to vďaka tomu, že rozpoznávajú nielen epitopy z HA, ale aj interné proteíny M, NP, PA a PB2 (7), ktoré sú v rámci jednotlivých suptypov konzervované.



Obrázok č. 2: **Indukcia humorálnej a bunkovej odpovede**, podľa (8)

Indukcia imunitnej odpovede po primárnej infekcii vírusom chrípky typu A je vyznačená plnými šípkami a pri opakovanom strete s tým istým vírusom dochádza k aktivácii pamäťových buniek (prerušované šípky). APC sú antigén prezentujúce bunky (napr. dendritické bunky DC), ktoré vytvárajú prepojenie medzi vrodenu a získanou imunitnou odpoveďou. Počas infekcie DC prezentujú antigén naivným a pamäťovým T a B lymfocytom. Th1 bunky produkujú IFN- γ a interleukín 2 (IL-2), taktiež podporujú tvorbu CTL (cytotoxické lymfocyty),

podieľajúcich sa pri navodení heterosuptypovej imunity. Th2 bunky produkujú IL-4, IL-5, IL-13 a podporujú aktiváciu a diferenciaciu B buniek, výsledkom ktorých je tvorba protilátok.

Vakcíny

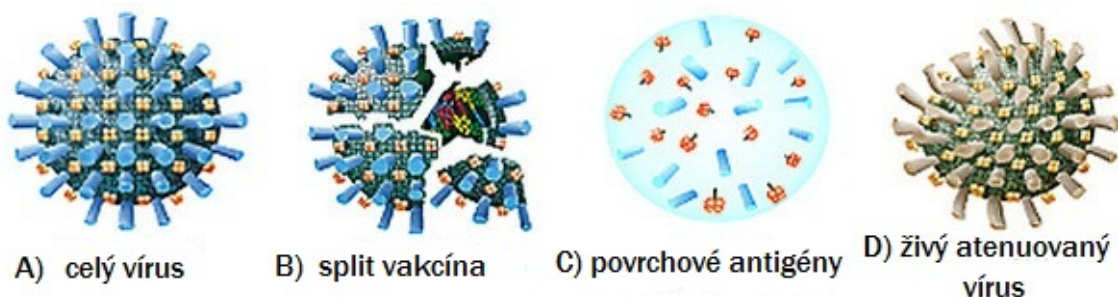
WHO spolupracuje so sieťou laboratórií a centier (Atlanta, GA - USA , Londýn – Veľká Británia, Melbourne - Austrália, Tokio - Japonsko, Peking - Čína) (9), ktorých úlohou je monitorovať epidemické kmene a na základe nich WHO stanoví zloženie vakcíny. Každoročne sú vo vakcíne obsiahnuté dva subtypy vírusu chrípky A – H1N1 a H3N2 a vírus chrípky typu B. V sezóne 2012-2013 budeme očkovaní (s nami celá severná pologuľa) nasledovnými kmeňmi:

- A/California/7/2009 (H1N1)-like virus;
- A/Victoria/361/2011 (H3N2)-like virus;
- B/Wisconsin/1/2010-like virus (z B/Yamagatarodu vírusov) (10).

V súčasnosti sú používané dva typy vakcín: inaktivované a živé atenuované vakcíny. Odlišujú sa v stimulácii imunitného systému a v spôsobe aplikácie.

Pomnožením vírusu v alantoickej tekutine kuracích embryí a jeho purifikáciou môžeme pripraviť vakcínu obsahujúcu celý virión - inaktivovaný chemickými látkami (obr. č. 3A). Ak je takýto virión rozštiepený detergentami, hovoríme o tzv. split vakcíne (obr. č. 3B). Purifikáciou povrchových subjednotiek hemagglutínínu a neuraminidázy je pripravená subjednotková vakcína (obr. č. 3C). Pri týchto typoch vakcín nie je možná reverzia na patogénnu formu vírusu. Inaktivované vakcíny stimulujú B-bunkovú odpoveď. CTL bunková odpoveď, ktorá je nevyhnutná pri odstránení vírusu z infikovaných tkanív (11), je pri tomto type vakcíny minimálna. Zvýšenie imunogénnosti inaktivovaných vakcín je dosiahnuté kombinovaním s adjuvantnými látkami. Vakcína sa obvykle podáva intramuskulárne.

Používanie živých atenuovaných vakcín (obr. č. 3D) je povolené v Rusku a USA (len pacienti vo veku 5 – 49 rokov (10)). Podanie tejto vakcíny je intranazálne v podobe aerosolu, imituje prirodzenú infekciu a poskytuje lokálnu krížovú imunitnú ochranu indukciou sérových IgA, IgG protilátok a CTLs (12, 13). Hoci sú omnoho imunogénnejšie, je tu obava spoločnosti, že by mohlo dôjsť k reverzii na patogénnu formu vírusu. Živé atenuované vírusy sú pripravené pasážovaním vírusového kmeňa pri teplote 25°C, čím vzniká kmeň množiaci sa len v hornom dýchacom trakte a neschopný množenia sa pri telesnej teplote.



Obrázok č. 3: **Typy inaktivovaných vakcín a živá atenuovaná vakcína**, podľa <http://www.ifpma.org/resources/influenza-vaccines/influenza-vaccines/about-influenza-vaccine.html> -podrobne pozrite v texte.

Adjuvantné látky

Slovo adjuvans pochádza z latinského adjuvare, čo znamená pomáhať. A práve adjuvantné látky sú také komponenty vakcíny, ktoré pomáhajú stimulovať imunitný systém čiže zosilňujú imunitnú odpoveď a tým zvyšujú účinnosť očkovania. Všetky proti-chrípkové vakcíny registrované v Slovenskej republike obsahujú ako adjuvans rôzne anorganické zlúčeniny ako napr. hydroxid hlinitý, fosforečnan hlinitý alebo fosforečnan vápenatý, ktoré uľahčujú vychytávanie antigénov bunkami prezentujúcimi antigén (14), tým pomáhajú stimulovať aj T bunkovú odpoveď.

Vakcíny a technológie vo vývoji

Sledovanie genetických zmien vírusov chrípky, navrhnutie, vyrobenie a rýchla distribúcia spôsobuje zvýšenie finančných nákladov v boji proti chrípke. Ideálne riešenie by bola univerzálna vakcína, ktorá by zabezpečila ochranu voči už existujúcim ako aj novo vznikajúcim kmeňom a taktiež voči vtáčim vírusom chrípky, ktoré stále predstavujú potenciálne nebezpečenstvo pre človeka.

Súčasne používané vakcíny sú produkované v kuracích embryách. Takáto produkcia je spojená s kontrolovaným chovom kurčiat, kde musia byť zabezpečené špecifické veterinárne a chovateľské podmienky, čo výrazne predražuje cenu vakcín. Je tu taktiež problém s ich množstvom v prípade pandémie a náhlej potrebe novej pandemickej vakcíny. Tieto problémy môžu byť vyriešené, napr. použitím stabilných bunkových kultúr (napr. MDCK alebo VERO). Ich výhoda spočíva v jednoduchšej manipulácii a v laboratórnom vybavení, vo vyššej produkčnej kapacite, čo sa odráža na ušetrenom čase a financiách.

Veľký potenciál majú *DNA vakcíny*, ktoré sú študované v laboratóriách po celom svete (34, 35, 36). Koncepcia DNA imunizácie spočíva v inzercii génu, kódujúceho vybraný antigén, do plazmidu a jeho následnom podaní hostiteľovi. Ich výhodou je, že indukujú tvorbu humorálnej aj bunkovej imunity, tak ako je to v prípade živej vakcíny, avšak pri DNA vakcínach nehrozí v žiadnom prípade reverzia na patogénnu formu vírusu (15). Ich schopnosť exprimovať všetky vírusové antigény, aj tie ktoré nepodliehajú mutáciám, im dáva možnosť indukovať imunitu voči rôznym kmeňom vírusov chrípky. Ďalšou výhodou, ktorú ponúka DNA vakcína je, že k produkcii nepotrebuje kuracie embryá, čím je bezpečná aj pre alergikov. Istá miera rizika je i pri DNA vakcínach. Nedá sa totiž úplne vylúčiť inkorporácia cudzorodej DNA do genómu ľudskej bunky, čo môže viesť k aktivácii bunkových protoonkogénov (16). Podanie DNA vakcíny môže byť rôzne, napr. intramuskulárne, intranazálne, subkutánne alebo prostredníctvom gene-gun.

Rekombinantné vírusové vakcíny, sú také, kde sa vybrané proteíny vírusu chrípky vložia do expresného vektora. Úlohou takéhoto expresného vektora je namnožiť cieľový antigén. Ako vektory boli využité napr. bakulovírusy (17) alebo vírus vakcínie (18). Na podobnom princípe pracujú aj *vírus vektorové vakcíny*, ktorých úlohou však nie je antigén množiť, ale dopraviť k bunkám imunitného systému. Ako „dopravný prostriedok“ je možné využiť napr. adenylát cyklázový toxín z mikroorganizmu *Bordetella pertussis* (19, v tlači). Sila týchto vírus vektorových vakcín spočíva v tom, že nie je potrebný adjuvans na zvýšenie imunogenicity.

Ako ďalšia možnosť prípravy vakcíny voči chrípke je fúzia flagelínu (vysoko konzervovaný proteín u baktérií, vytvárajúci vlákna bakteriálneho bičička) spolu s receptorom,

ktorý ho rozpoznáva (TLR5) a globulárnou časťou HA (20) alebo extracelulárnou doménou M2 proteínu (21). Kombinácia flagelínu, TLR receptora a požadovaného antigénu, výrazne zvyšuje imunogenicitu daného antigénu (33).

Významný pokrok v príprave proti chrípkovej vakcíny zohrala metóda reverznej genetiky. Táto metóda umožňuje pripraviť vírusy so žiadanými mutáciami, ktoré môžu vírus oslabiť avšak dovoľia mu zachovať si všetky imunogénne vlastnosti. Takto môžu vznikáť napríklad vírusy bez NEP, kde sa síce všetky ostatné proteíny namnožia, ale nevytvoria infekčnú vírusovú časticu, ktorá by sa bola schopná šíriť ďalej (22).

V poslednej dobe upriamujú vedci svoju pozornosť na konzervatívne oblasti antigénov vírusov chrípky, ktoré by navodili takú imunitnú odpoveď, ktorá by chránila pred obvyčajnou sezónnou, ako aj pred pandemickou chrípkou, ktorá možno práve teraz vzniká vo vhodnom hostiteľovi, v ošipanej. Medzi takéto antigény s konzervatívnymi oblasťami patria: HA2, NP, NA, M1 a M2 proteín. Výhoda M2 proteínu spočíva v konzervatívnosti extracelulárnej domény (eM2), ktorá sa od prvej izolácie vírusu chrípky z roku 1933 takmer nezmenila. eM2 je sám o sebe slabým imunogénom, preto sa vedecké tímy po celom svete snažia jeho imunogenicitu zvýšiť, napríklad fúzaním eM2 s jadrovým proteínom hepatitídy B (23, 30), s rekombinantným adenovírusom exprimujúcim eM2 (31) alebo konjugáciou s proteínovým komplexom vonkajšej membrány *Neisseria meningitidis* (32). Ďalší antigén, ktorý je v centre záujmu je HA2, ľahký reťazec hemagglutínínu, ktorý je v natívnom stave maskovaný globulárnou časťou hemagglutínínu (HA1). Pre zvýšenie jeho imunogenity sa HA2 sprístupňuje napr. odstránením HA1 oblasti, vystavením pH 5,0, kedy dochádza k reštrukturalizácii HA, čím sú epitopy na HA2 sprístupnené pre protilátky alebo konjugáciu na proteínový nosič (24, 37).

Veľmi zaujímavá je aj správa, ktorá vzišla z laboratória imunológa Antonia Lanzavecchia zo švajčiarskeho inštitútu, kde identifikovali protilátku, ktorá sa viaže na dovtedy známych 16 subtypov HA vírusu chrípky typu A (vrátane H1N1, H3N2 a taktiež obávaný vtáči vírus H5N1). Táto protilátka dostala pomenovanie F16 (25). Účinok tejto protilátky bol potvrdený pri infekcii myši a fretiek letálnymi dávkami rôznych subtypov vírusov chrípky (26).

Očkovanie proti chrípke na Slovensku

V chrípkovej sezóne 2011/2012 boli podľa výročnej správy UVZSR (Úrad verejného zdravotníctva Slovenskej republiky) na očkovanie proti chrípke použité tieto vakcíny: Vaxigrip a Vaxigrip Junior (Sanofi Pasteur), Fluarix (GlaxoSmithKline), Influvac (Solvay Pharma) a vakcína s intradermálnou aplikáciou ID Flu (Sanofi Pasteur), prvý krát použitá v sezóne 2010/2011. Vakcína s intradermálnou aplikáciou využíva mikroi ihlu dlhú 1,5mm a hrubú 0,31mm, ktorá je najmenej 10-krát menšia ako klasická intramuskulárna ihla. Vakcína sa vpravuje do kože, ktorá je miestom obsahujúcim nespočetné množstvo imunokompetentných buniek, čiže antigén je doručený napr. priamo k makrofágom alebo dendritickým bunkám (27). Podľa UVZSR dosiahla zaočkovanosť populácie Slovenskej republiky v sezóne 2011/2012 - 7,5%, čo predstavuje pokles o 1,6 % v porovnaní s predchádzajúcou sezónou a pokles až o 4,9% v porovnaní so sezónou 2009/2010. Od 30%-tnej preočkovanosťi populácie, ktorá je vytyčeným cieľom WHO sme ešte poriadne ďaleko.

Aj napriek jednoznačnej snahe vedcov v oblasti vývoja univerzálnej vakcíny, vírus chrípky je stále krok pred nimi. Dôkazom toho je aj posledné úmrtie na obávanú vtáčiu chrípku H5N1 v Indonézii, ktorej dňa 31.7.2012 podľaohol 37 ročný muž (28). Je možné, že keď teraz čítate tento článok, už nie je poslednou obeťou!

Slovník pojmov:

Alantoická tekutina	tekutina v alantoickej dutine kuracieho embrya, vhodná na množenie vírusu chrípky	mRNA	mediátorová RNA, vzniká počas transkripcie, prepisom z DNA a kóduje proteín
Apoptóza	programovaná bunková smrť	NK bunky	natural killers, prirodzené zabíjajúce bunky, súčasť vrodenej imunitnej odpovede reagujúcej na bunky nádorové a napadnuté vírusom
Cytokíny	základné regulátory imunitného systému (patria sem napr. interleukíny alebo interferóny)	Pasážovanie	proces, pri ktorom sú kolónie buniek prenášané do nového kultivačného média
Dentritické bunky	spracovávajú a prezentujú antigén T a B lymfocytom	PKR	RNA závislá proteín kináza, potláča replikáciu vírusu
Detergent	látka znižujúca povrchové napätie molekúl, čím dôjde k rozrušeniu vírusovej membrány	Plazmidy	dvojlákové cirkulárne molekuly DNA, replikujúce sa nezávisle od chromozómu, slúžiaca ako vektor v génovom inžinierstve
Gene – gun	nastrelovanie DNA do cieľových buniek tzv. génovou puškou	Polymerázový komplex	replikázová a transkriptázová aktivita vírusu, zložený z troch podjednotiek PB2, PB1 a PA
Interferóny	dôležité zložky neadaptívnej antivírusovej odpovede	Replikácia	syntéza dcérskych reťazcov nukleovej kyseliny na základe materského reťazca
Interleukíny	veľmi rôznorodá skupina cytokínov, regulujúca množstvo funkcií, prevažne sa ich regulácia zameriava na T lymfocyty	RNP	ribonukleoproteín, spoločný názov zahrňujúci komplex RNA s PB2, PB1, PA a NP proteínmi
Intramuskulárna aplikácia	aplikácia látky do svalu	Stabilná bunková línia	populácia buniek, ktoré sa môžu pestovať nekonečne dlho
Intranzálna aplikácia	aplikácia látky na epitel nosnej dutiny	Subkutánna aplikácia	podkožná aplikácia
Komplement	sústava zhruba 30 - 40 proteínov, ktoré kooperujú medzi sebou a medzi ostatnými zložkami imunitného systému	TNF	tumor necrosis factor, faktor nekrotizujúci nádor, cytokín
Letálna dávka	riedenie vírusu, spôsobujúce smrť jedinca	Transkripcia	prepis genetickej informácie z molekuly DNA do molekuly mRNA
Makrofágy	fagocytujúce bunky (pohlčujúce patogén)	VERO bunky	stabilná bunková línia opičích obličkových buniek, VERO je skratka odvodená z Verda Reno, v esperantskom jazyku- zelená oblička (29)
MDCK bunky	stabilná bunková línia psích obličkových buniek, Madine Darby Canine Kidney cells	Virión	jednotlivá častica vírusu schopná napadnúť bunku a rozmnožovať sa

Literatúra:

- (1) Salk J. E. a kol. Protective effect of vaccination against Influenza B, (Received for publication December 19, 1944), <http://www.jci.org/articles/view/101634/files/pdf>
- (2) Wise H. M. a kol. (2011): Overlapping signals for translational regulation and packaging of influenza A virus segment 2. *Nucleic Acids Research*, 39(17):7775–7790.
- (3) Wise H. M. a kol. (2009): A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol.*, 83(16):8021-31. Epub 2009 Jun 3.
- (4) Mitchell R. W. a kol. (2008): Innate immunity to influenza virus: implications for future therapy, *Expert Rev Clin Immunol*, 4(4):497–514.
- (5) Wright P. F. a Webster R. G., kapitola 47 - Fields - Virology (Two Volumes) 4th Edition (August 2001), Lippincott Williams and Wilkins Publishers.
- (6) García-Sastre A. a kol. (1998): Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology*, 252:324–330.
- (7) Legge K. L. a Braciele T. J., kapitola 5 - Influenza Virology, Current topics, Caister Academic Press, GB (2006), strana 157.
- (8) Sandt C. E. a kol. (2012): Evasion of Influenza A Viruses from Innate and Adaptive Immune Responses, *Viruses*, 4, 1438-1476; doi:10.3390/v4091438
- (9) http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201202_recommendation.pdf
- (10) WHO, <http://www.who.int/wer/2005/wer8033.pdf>
- (11) Staneková Z. a Varečková E. (2010): Conserved epitopes of influenza A virus inducing protective immunity and their prospects for universal vaccine development. *Virology Journal*, 7:351.
- (12) Stropkovská A., Janulíková J., Varečková E. (2010): Trends in development of the influenza vaccine with broader cross-protection. *Acta virologica* 54: 7 – 19, 2010.
- (13) Murphy B. R. a Clements M. L. (1989): The systemic and mucosal immune response of humans to influenza A virus. *Curr. Top. Microb. Immunol.*, 146, 107–116.
- (14) Štůvská M. (2007): Prevencia chrípky očkováním, *Via pract.*, 4 (9): 414–416
- (15) Košík I. a kol. (2012): A DNA vaccine expressing PB1 protein of Influenza A virus protects mice against virus infection. *Arch Virol.*, 157(5):811-7
- (16) Wang Z. a kol. (2004): Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. *Gene therapy.*, vol. 11, no. 8, 711-721 s. doi:10.1038/sj.gt.3302213
- (17) Alexander Sabo a kol., Chrípka, vydavateľstvo VEDA, BA, 2007
- (18) Alstein A.D. a kol. (2006): Immunization with influenza A NP-expressing vaccinia virus recombinant protects mice against experimental infection with human and avian influenza viruses. *Arch Virol.*, 151(5):921-31. Epub 2005
- (19) Staneková a kol. (2012): Heterosubtypic protection against influenza induced by adenylate cyclase toxoids delivering conserved HA2 subunit of hemagglutinin. *Antiviral research*, v tlači.
- (20) Song L. a kol. Efficacious recombinant influenza vaccines produced by high yield bacterial expression: A solution to global pandemic and seasonal needs, *PLoS ONE* 3(5): e2257. <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0002257>

- (21) Turley Ch. B. a kol. (2011): Safety and immunogenicity of a recombinant M2e–flagellin influenza vaccine (STF2.4xM2e) in healthy adults. *Vaccine*, Volume 29, Issue 32, Pages 5145–5152.
- (22) Watanabe T. a kol. (2002): Immunogenicity and protective efficacy of replication - incompetent influenza virus-like particles. *J Virol.*, 76(2): 767–773.
doi: 10.1128/JVI.76.2.767-773.
- (23) Neiryneck S. a kol. (1999): A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat Med*, 5:1157-1163.
- (24) Varečková E. a kol. (2003): A monoclonal antibody specific to the HA2 glycoprotein of influenza A virus hemagglutinin that inhibits its fusion activity reduces replication of the virus. *Acta virologica* 47: 229 – 236.
- (25) Schlütter J. (2011): Vaccine for all seasons. *Nature*, vol 480.
- (26) Corti D. a kol. (2011): A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins, *Science*, 333, 850, DOI: 10.1126/science.1205669
- (27) Avidičová M. (2009): Intradermálna vakcína proti chrípke– vakcína budúcnosti *Viapract.*, 6 (12): 506–508
- (28) <http://www.slobodavockovani.sk/news/maly-epidemiologicky-slovník/>
- (29) Filette M. a kol. (2005): Universal influenza A vaccine: optimization of M2-based constructs. *Virology*, 337(1):149-161
- (30) Tompkins S.M., (2007): Matrix protein 2 vaccination and protection against influenza virus, including subtype H5N1, *Emerg Infect Dis.*; 13(3): 426–435
- (31) Fan J. a kol. (2004): Pre-clinical study of influenza virus A M2 peptide conjugate vaccines in mice, ferrets, and rhesus monkeys. *Vaccine*, 22 (23–24), pp. 2993–3003
- (32) Huleatt J. W. a kol. (2008): Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. *Vaccine*, 26 (2): 201–214.
- (33) Gao Y. a kol. (2012): Characterization of Immune Responses Induced by Immunization with the HA DNA Vaccines of Two Antigenically Distinctive H5N1 HPAIV Isolates. *PLoS One*, 7(7): e41332. Epub 2012 Jul 31.
- (34) Wei H. a kol. (2012): DNA-Vaccine Platform Development Against H1N1 Subtype of Swine Influenza A Viruses. *Viral Immunol.*;25(4):297-305. Epub 2012 Jul 20.
- (35) Lin F a kol. (2012): Optimization of electroporation-enhanced intradermal delivery of DNA vaccine using a minimally invasive surface device. *Hum Gene Ther Methods*. 2012 Jun;23(3):157-68. Epub 2012 Jul 13.
- (36) Staneková Z. a kol. (2011): Heterosubtypic protective immunity against influenza A virus induced by fusion peptide of the hemagglutinin in comparison to ectodomain of M2 protein. *Acta virologica*, 55: 61-67.