

Uloga imunosustava u kontroli pandemije influence

*Alenka GAGRO*¹⁾, *dr. sc., dr. med.*
*Alma-Martina CEPIKA*¹⁾, *dr. med.*
*Ela KOSOR*¹⁾, *dipl. ing.*
*Igor MARINIĆ*²⁾, *dr. med.*
*Ilija KUZMAN*³⁾, *prof. dr. sc., dr. med.,*
specijalist infektolog
*Tatjana JEREN*³⁾, *prof. dr. sc., dr. med.,*
specijalist infektolog
*Vladimir DRAŽENović*⁴⁾, *dr. med.,*
specijalist mikrobiolog
*Snježana RAKUŠIĆ*³⁾, *dr. med.,*
specijalist infektolog
*Gordana MLINARIĆ-GALINOVIĆ*⁴⁾, *prof.*
dr. sc., dr. med., specijalist mikrobiolog

¹⁾Imunološki zavod, Zagreb

²⁾Klinička bolnica »Dubrava«, Zagreb

³⁾Klinika za infektivne bolesti »Dr. Fran
Mihaljević«, Zagreb

⁴⁾Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb

Ključne riječi

gripa
pandemija
imunost
cjepivo

Key words

influenza
pandemic
immunity
vaccine

Primljeno: 2006–01–23

Received: 2006–01–23

Prihvaćeno: 2006–02–16

Accepted: 2006–02–16

Uvod

Virusi gripe pripadaju porodici *Orthomyxoviridae* i dijele se na tipove A, B i C koje razlikujemo po dva unutrašnja proteina, nukleoprotein (NP) i proteinu matriksa (M) [1]. Ta se tri tipa virusa gripe razlikuju u organizaciji genoma kao i virulenciji. Virus influence tipa A uzrokuje bolesti u čovjeka, svinja i ptica. Do sada je zabilježeno 16

Stručni članak

Virusi gripe su jednolančani RNA virusi koji pripadaju porodici *Orthomyxoviridae*. Postoje 3 tipa virusa: A, B i C, koji se razlikuju po virulenciji i genomskoj strukturi. Mutacijom gena dvaju površinskih proteina virusa influence, hemaglutinina i neuraminidaze, nastaju antigenske promjene na površini virusne čestice. Zahvaljujući tim promjenama, zaštitna uloga imunosustava može postati neadekvatna ako se virus influence izmijeni u tolikoj mjeri da sadrži antigene na koje osoba nema razvijenu niti humoralnu niti staničnu imunost. Težina kliničke slike u gripi ovisit će tada o sposobnosti virusa influence da zaobiđe ili inhibira različite imunološke mehanizme kojima je cilj eliminacija virusa iz organizma. Upravo sposobnost promjene antigenskih determinanti otežava razvoj cjepiva dovoljno sličnom epidemijском odnosno pandemijskom soju virusa gripe. U ovom radu raspravit će se uloga imunološkog sustava u obrani organizma od virusa influence s posebnim osvrtom na dosadašnje spoznaje o imunološkoj reakciji u ljudi inficiranih mogućim pandemijskim virusom H5N1.

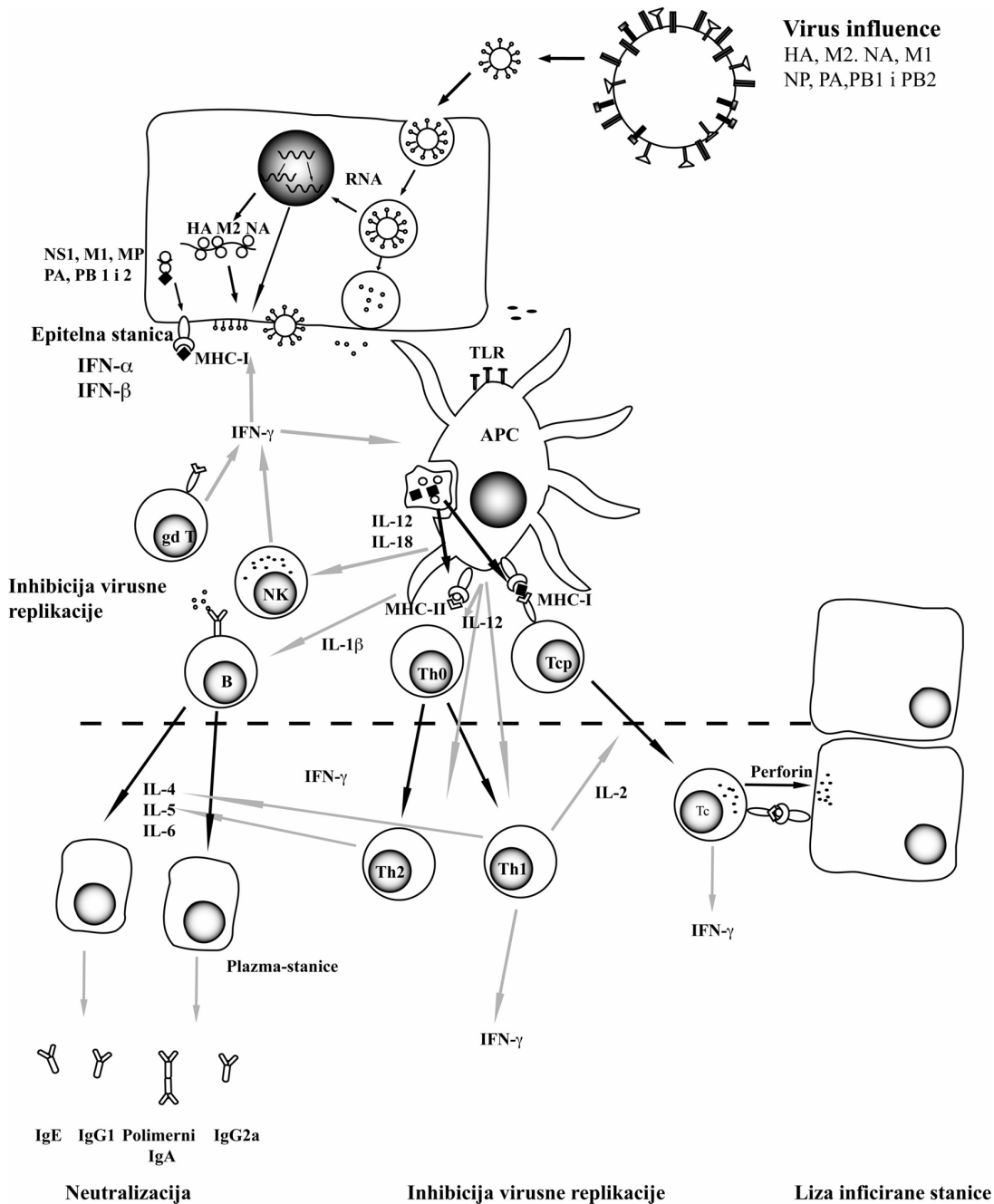
The role of immune system in control of the influenza pandemic

Professional paper

Influenza virus is a single-stranded RNA virus of *Orthomyxoviridae* family. The 3 types of influenza virus, A, B and C, differ in virulence and genomic structure. Frequent mutations in viral surface glycoproteins, hemagglutinin and neuraminidase, result in the changes of antigenic determinants. As a consequence, protective role of immune system becomes inadequate if the changes of influenza virus are significant and accompanied with lack of existing humoral and cellular immunity in an infected individual. The severity of clinical presentation will depend on the capacity of influenza virus to evade or to inhibit different immunologic mechanism, which aim to eliminate the virus from the body. The frequent changes of influenza antigens also hamper the timely development of vaccine as a most important measure to protect from potential influenza epidemics or pandemics. In this paper we discuss the role of immune system in protection from influenza infection with special emphasis on the known findings of immune response in H5N1-infected individuals.

različitih hemaglutininskih i 9 neuraminidaznih serotipova virusa tog tipa. Kod virusa tipova B i C koji uzrokuju bolesti isključivo u čovjeka, serotipovi se ne mogu razlikovati.

Genomska informacija virusa influence sadržana je unutar jednolančane negativne virusne ribonukleinske kiseline (vRNA) [1]. Virusi influence tipa A i B imaju



Kratice: HA: hemaglutinin; M1: protein matriksa 1; M2: protein matriksa 2; NA: neuraminidaza; NP: nukleoprotein; PA: polimeraza; PB1: polimeraza 1; PB2: polimeraza 2, TLR: Toll-sličan receptor

Slika 1. Prikaz glavnih imunoloških mehanizama u imunoreakcijama na virus influence
Figure 1. Description of major immune mechanisms in immunoreactions to influenza virus

genom sastavljen od osam, a virus tipa C od sedam segmenata jednolančane RNA. Glikoproteini hemaglutinin (HA) i neuraminidaza (NA) čine glavne dijelove vanjske lipidne ovojnice virusa i ključni su za infekciju, patogenost i tkivni tropizam virusa (HA) te otpuštanje novonastalih virusnih čestica (NA). Mutacijom gena ovih dvaju proteina nastaju izrazite antigenske promjene na

površini virusne čestice. Zahvaljujući promjenama tih proteina virusa influence, protektivna uloga imunostava može postati neadekvatna ako se virus influence izmijeni u tolikoj mjeri da sadrži antigene na koje osoba nema razvijenu niti humoralnu niti staničnu imunost. Težina kliničke slike u gripi ovisit će tada o sposobnosti virusa influence da zaobiđe ili inhibira različite imunološke meha-

nizme kojima je cilj eliminacija virusa iz organizma (slika 1).

Sluznica dišnih putova u gripi

Sluznica dišnih putova mjesto je ulaska virusa influence u organizam kao i mjesto imunološke reakcije [2]. Virus influence se HA veže za sijalinske kiseline na molekula epitelnih stanica te ih inficira, nakon čega slijedi replikacija virusa. Nekoliko sati nakon početka infekcije, novonastali virusi izlaze iz epitelnih stanica djelovanjem NA. Stoga su intaktne sluznice, trepetljike respiratornog epitela, zaštitne molekule u slini i sekretu u respiratornim putovima prve barijere koje sprječavaju infekciju.

U sekretu dišnih putova nalazi se tako inhibicijski čimbenik sličan N-acetilneuraminskoj kiselini HA virusa influence koji ometa vezanje HA za receptor [3]. U sekretu dišnih putova nalaze se i različiti topljivi čimbenici koje izlučuju stanice dišnog sustava i koji posjeduju endogeno antimikrobno djelovanje te su dio tzv. nespecifične imunosti. Neutrofilu u sputumu inficirani virusom influence luče značajno manje lizozima i imaju sniženu baktericidnost pa se tako objašnjava pojačana prijemčivost na sekundarne bakterijske infekcije u oboljelih od gripe [4]. Defenzini također djeluju zaštitno tako što inhibiraju infekciju virusom gripe sprječavajući vezanje HA za sijalinske kiseline [5]. Također je pokazano da kolektini, u koje ubrajamo i surfaktantske proteine A i D, vežu i neutraliziraju viruse influence [6].

Aktivacija komplementa također je važan dio obrane u infekciji virusom influence jer predstavlja sponu između urođene i stečene imunosti. Nedostatak komponente komplementa C3 i C5a tako će rezultirati težom infekcijom u inficiranih virusom influence [7].

Nespecifična (urođena imunost)

Imunološki sustav ima funkciju održanja homeostaze i obranu integriteta organizma od različitih patogena iz okoliša. Prema načinu djelovanja, imunost dijelimo u dvije osnovne podgrupe: prirodenu i stečenu imunost. Prirodenu imunost sačinjavaju stanični i topljivi medijatori koji započinju imunološku reakciju na infekciju virusom influence i brzo prepoznaju njegove antigene, pri čemu ne koriste antigen-specifične receptore. Iako mehanizmi nespecifične imunosti djeluju odmah, oni ne omogućuju razvoj trajne zaštitne imunosti ili tzv. imunološke memorije, na prethodni kontakt s virusom. Virus influence pokreću nespecifičnu imunost različitim mehanizmima. Molekule koje na svojoj površini nose stanice nespecifične imunosti (npr. monociti i dendritičke stanice) prepoznaju virusnu RNA Toll-u sličnim receptorom 7 (TLR7), nakon čega se aktiviraju i luče proupalne citokine kao što su IL-1 α , TNF- α i IL-6 te kemokine koji pojačavaju upalu i tako omogućuju eliminaciju virusa influence

[8]. Tim mehanizmima, stanice nespecifične imunosti koje nemaju antigen-specifične receptore, razlikuju virusnu RNA od ostalih molekula.

Važni čimbenici u urođenoj imunosti u gripi su i interferoni (IFN) tipa I (IFN-alfa i IFN-beta) koji inhibiraju virusnu replikaciju i staničnu proliferaciju, povećavaju litičku sposobnost urođenoubilačkih stanica (NK, od engl. *natural killer*) i mijenjaju ekspresiju molekula glavnog kompleksa tkivne snošljivosti (HLA, od engl. *human leukocyte antigen*), ali pri tome ne djeluju na inficirane stanice [9]. Važno je istaknuti da je lučenje interferona neovisno o replikaciji virusa influence i TLR7 [8].

NK-stanice su osobito važne za obranu od virusa influence. Pored Fc-receptora, na svojoj površini imaju veliki broj receptora koji su važni za ubijanje virusima inficiranih stanica. Tako razlikujemo ubilačke aktivacijske (KAR, od engl. *killing activating receptor*) i ubilačke inhibicijske molekule (KIR, od engl. *killer inhibitory receptor*). Svoje djelovanje NK-stanice usmjeravaju prema onim stanicama koje na svojoj površini imaju promijenjenu (sniženu ili je nema uopće) ekspresiju molekula HLA-klase I ili u slučaju kada je afinitet i avidnost liganda za KAR- i KIR-molekule značajno izmijenjena. Ako su stanice inficirane virusom influence, NK-stanice se pojačano vežu KIR-ovima za stanice inficirane virusom influence iako na površini inficirane stanice nema jasne promjene u razini molekula HLA-klase I [10]. Tim mehanizmima virus influence inhibira citotoksičko djelovanje NK-stanica.

Stečena imunost

Za razliku od urođene (nespecifične) imunosti, stečena imunost na virus influence razvija se tek nakon prepoznavanja i procesiranja antigena te sazrijevanja T- i B-limfocita u efektorske stanice. Stoga je za razvoj tih imunoreakcija potrebno vrijeme za razliku od imunoreakcija urođene imunosti. Važno obilježje stečene imunosti na virus gripe je memorija jer se pri ponovnom susretu s virusom, imunoreakcija odvija brže i snažnije zahvaljujući postojanju za antigen specifičnih memorijskih T- i B-limfocita.

Humoralna imunost

U sekretu dišnog sustava nalaze se antitijela klase IgA i u manjoj mjeri klase IgM koja specifično prepoznaju antigene virusa influence [11]. U osobe koja je preboljela influencu IgA-posredovana imunost može se dokazati i nekoliko mjeseci nakon infekcije; tako se u tih osoba u slini nalaze specifična IgA antitijela, a u tonzilama i memorijski B-limfociti iz kojih će nastati plazma-stanice koje izlučuju za influencu specifična IgA antitijela. Antitijela klase IgG koja se nalaze u serumu štite donje dišne putove i preveniraju nastanak pneumonije [11]. Antitijela na površinske glikoproteine virusa influence, anti-HA i anti-NA važna su za rezistenciju na infekciju, dok antitijela na

nepromjenjive unutrašnje antigene virusa, matriks protein (M) i nukleoprotein (NP) nisu zaštitna [2]. Dva su glavna mehanizma kojima antitijela kontroliraju infekciju u gripi: a) inhibicija širenja infekcije neutralizacijskim antitijelima na HA, i b) inhibicija širenja novonastalih virusa na druge, još neinficirane stanice u organizmu NA-specifičnim antitijelima.

Stanična imunost

Osim humoralne imunosti, vrlo važnu ulogu u infekciji virusom influence imaju i T-limfociti. T-limfociti ne prepoznaju cijele viruse influence već samo kratke ulomke (od 9 do 15-tak aminokiselina) peptida koji su nastali antigenskim procesiranjem virusa u antigen-prezentirajućim stanicama [12]. Virusni antigeni uklopljeni u molekule HLA nalaze se na površini stanica gdje ih prepoznaju za virus specifični T-limfociti. Citotoksički T-limfociti prepoznaju antigene influence vezane za žlijebove molekula klase HLA-I, a pomoćnički T-limfociti antigene vezane za molekule klase HLA-II. Čim molekula TCR-a veže peptid nastao antigenskim procesiranjem virusa u antigen-prezentirajućoj stanici u sklopu vlastite molekule HLA (tzv. prvi signal), ta se veza dodatno učvrsti pojačanim vezanjem za antigen nespecifičnih parova adhezijskih molekula kao što su CD54-CD11/CD18 i CD58/CD2. Kad se jednom ta veza učvrsti, aktivacijski signal se preko tirozinskih kinaza vezanih za unutarnje dijelove CD3 i CD4 ili CD8, šalje u T-limfocitnu unutrašnjost. Vezanjem kostimulacijskih molekula CD28 (tzv. drugi signal) na molekule B7 (CD80 ili CD86) na antigen-prezentirajućoj stanici stabilizira se glasnička RNA za T-limfocitne citokine (npr. IL-2) i potiče klonska ekspanzija te diferencijacija T-limfocita. Zahvaljujući klonskoj ekspanziji, broj specifičnih T-limfocita u infekciji virusom influence dramatično raste i opisano je da se njihovoj broj povisi i do 1000 puta [13].

Citotoksički T-limfociti (CTL) za razliku od NK-stanica, ubijaju ciljane stanice nakon što na njima prepoznaju antigene za koje su specifični. CTL (CD8+) specifični za virus influence obično se pojavljuju tek 3–4 dana nakon početka infekcije. Njihova je uloga prepoznavanje virusnih antigena i liza virusom inficiranih stanica, pa tako prvenstveno imaju ulogu ne toliko u zaštiti od same infekcije već u odstranjenju virusa, oporavku od infekcije i sprječavanju nastanka komplikacija. Od svih proteina virusa influence čini se da su za uspješnu obranu važni oni CD8+ CTL koji prepoznaju dijelove nukleoproteina i matriksa virusa influence [14]. CTL ubijaju ciljane stanice nakon što na njima prepoznaju antigene za koje su specifični uklopljene u žlijebove molekula HLA klase I. Nakon prepoznavanja antigena, te se stanice aktiviraju i izlučuju topljive čimbenike (perforini, granzimi) koji omogućuju razaranje ciljane stanice ili je to ubijanje inducirano interakcijom površinskih molekula od kojih je najvažnija in-

terakcija FAS – FAS ligand. Više je dokaza koji podupiru vrlo važnu ulogu HLA-I-spregnutih CD8+ CTL u influenci. Tako je pokazana njihova aktivnost u plućima inficiranih te korelacija porast broja CD8+ T-limfocita s odstranjenjem virusa iz organizma [13]. Važno je i naglasiti da je stanična citotoksička imunost često unakrsno reaktivna prema podtipovima virusa influence zbog sličnosti u antigenskoj građi [11].

Za razliku od CTL, pomoćnički T-limfociti pomažu djelovanje citotoksičkih T-limfocita i surađuju s B-limfocitima pri stvaranju za virus specifičnih antitijela [15]. Pomoćnički T-limfociti nakon prepoznavanja antigena se diferenciraju iz Th0 u upalne (Th1) i u pomoćničke (Th2) limfocite. Th1-limfociti luče interferon- γ (IFN- γ), IL-2 i TNF koji aktiviraju makrofage i citotoksičke T-limfocite. Th2-limfociti proizvode IL-4, IL-5, IL-10 i IL-13 kojima stimuliraju B-limfocite na proizvodnju antitijela. Glavni čimbenici koji usmjeruju diferencijaciju T-limfocita su citokini IL-4 (prema Th2) i IL-12 (Th1). Usmjerenje Th0-limfocita u Th1- ili Th2-smjeru je važno za ishod imunoreakcije na viruse. Tako su upravo Th1-limfociti neophodni za eliminaciju stanica zaraženih virusom influence [15, 16].

Imunoreakcija na mogući pandemijski soj virusa influence

Nakon uspješno preboljele influence stvara se zaštitna imunost koja u imunokompetentne osobe može biti dugotrajna pa se time značajno smanjuje mogućnost ponovne infekcije istim ili antigenski sličnim virusom influence. Međutim, u slučajevima kada su promjene u genomu virusa toliko velike da od ranije postojeća imunost nakon prirodno preboljele infekcije kao ni imunost koja se postiže cijepljenjem nije učinkovita u obrani od infekcije, realno je očekivati da će broj inficiranih osoba (čak i potpuno imunokompetentnih) biti velik upravo zbog nepostojeće humoralne i stanične imunosti.

Infekcijama virusom gripe i inače su podložnija djeca i osobe starije životne dobi zbog kvalitativnih promjena vezanih za sposobnost imunološkog sustava da adekvatno prepozna i eliminira virus influence te će oni i dalje biti posebno vulnerabilna populacija u slučaju pandemije influence [17, 18]. Poznato je da se u starijoj životnoj dobi mijenja sposobnost izlučivanja citokina iz monocita i makrofaga, i to posebno interferona-gama, T-limfociti se slabije i sporije razmnožavaju, a i antitijela se sintetiziraju u značajno manjem titru. Pored starenja imunološkog sustava (tzv. imunosenescencije), poremećenoj imunoreaktivnosti najvjerojatnije doprinose malnutricija, komorbiditet (npr. šećerna bolest, kronična opstruktivna plućna bolest) koji su česti u starijih osoba i doprinose težini respiracijskih infekcija [19]. I u djece se povećana incidencija pobola od gripe objašnjava prvenstveno funkcionalnom nezrelošću imunostava.

Dostupni podatci o imunološkim reakcijama u infekciji mogućim pandemijskim virusom H5N1 u ljudi su vrlo oskudni [20–25]. Sekvenciranjem genoma virusa koji je izazvao pandemiju influence 1918. godine i bio izrazito virulentan, pokazano je velika sličnost tog virusa i onog koji izaziva ptičju gripu [26, 27]. Izrazito teška klinička slika infekcije H5N1 virusom u ljudi inicijalno je bila povezana s građom virusne ovojnice oko hemaglutinina tog virusa influence koja je vrlo podložna na cijepanje tkivnim proteazama čime se omogućava brza ekstrapulmonalna diseminacija virusa. Danas se, međutim, pretpostavlja da je izrazita virulencija povezana s ukupnim genskim promjenama u tom virusu te nije posljedica točkastih promjena u genomu. Nestrukturalni protein NS1 virusa H5N1 inhibira antivirusni efekt posredovan interferonom i TNF-alfa tijekom početne imunoreakcije posredovane stanicama nespecifične imunosti. Pored toga, razina lučenja proupalnih citokina (TNF-alfa, IL-6, IL-1beta, IL-8, MCP-1 i IFN-gama) i solubilnog citokinskog receptora za IL-2 ekstremno je visoka u usporedbi s infekcijama ostalim virusima influence A kao što su H1N1 i H3N2 pa se javlja efekt tzv. citokinske oluje te smrt u inficiranih osoba nastupa i bez ekstrapulmonalne diseminacije virusa [25]. Vežanjem hemaglutinina na sijalinske kiseline na epitel dišnih putova dolazi i do brze inhibicije ionskih kanala pa se posljedično javlja jaki edem što doprinosi slomu respiracijske funkcije. U bolesnika je također opažena izrazita limfopenija uz poremećeni odnos pomoćničkih i citotoksičkih T-limfocita (engl. CD4/CD8 *ratio*) i hemofagocitoza za koje se također pretpostavlja da su posljedica citokinske disregulacije [22].

Opažene promjene u ranoj imunološkoj reakciji na infekciju u slučaju pandemije značajno izmijenjenim ili novim sojem virusa influence stoga mogu dovesti i do letalnog ishoda upravo zbog nepostajanja od ranije stvorene imunosti i nedostatka vremena da se razviju mehanizmi specifične imunosti posredovani antitijelima i T-limfocitima.

Antivirusni lijek oseltamivir (Tamiflu®) iz skupine neuraminidaznih inhibitora, trenutno se koristi za prevenciju i liječenje influence tipa A i B. Međutim, posljednja istraživanja provedena na ljudima oboljelim od H5N1 soja virusa gripe pokazala su njegovu rezistenciju na ovaj antivirusni lijek [28, 29].

Kako nam spoznaje o imunoreakciji na virus influence mogu pomoći u razvoju cjepiva protiv pandemijskog soja influence?

Dugogodišnje iskustvo s postojećim cjepivima protiv gripe pokazala su da cjepivo treba sadržavati soj virusa koji je vrlo sličan epidemijskom soju. Smatra se da praćenje epidemiološke situacije koje se koordinirano provodi pod patronatom Svjetske zdravstvene organizacije nije dostatno za pravovremeno prepoznavanje soja virusa s pandemijskim karakteristikama.

Smatra se da bi idealno cjepivo trebalo inducirati unakrsnu imunoreaktivnost na podtipove H1-H16 virusa influence [30, 31]. Za razvoj takvog cjepiva nužno je identificirati sačuvane epitope u molekuli hemaglutinina kako bi se nakon cjepljenja mogla potaknuti unakrsno reaktivna zaštitna neutralizirajuća antitijela. Budući da su dosadašnja istraživanja pokazala da se u ljudi ne potiče lučenje antitijela na višestruke podtipove HA, nužno je razviti metode i nove pristupe kojima bi se aktivirala imunost u ljudi, uključujući korištenje adjuvanata u cjepivima. Jedan od načina je i pokušati identificirati epitope koje prepoznaju citotoksički CD8+ T-limfociti, te razviti nova, tzv. T-limfocitna cjepiva [31, 32]. Istraživanja na eksperimentalnim životinjskim modelima upućuju i na važnost antitijela na protein M2 virusa influence [33]. Taj je protein važan za nastajanje protonske pumpe na virionu i unutarstaničnoj membrani te otpuštanje virusnih gena iz endosoma. Međutim, kliničke studije koje bi potvrdile te hipoteze i u ljudi još nisu napravljene.

Literatura

- [1] Wright PF, Webster RG. Orthomyxoviruses. U: Knipe D, Howley P i sur., ur. Fields Virology. 4. izd. Vol.1. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001;1533–1579.
- [2] Tamura S, Kurata T. Defense mechanisms against influenza virus infection in the respiratory tract mucosa. *Jpn J Infect Dis* 2004;57:236–47.
- [3] Shugars DC. Endogenous mucosal antiviral factors of the oral cavity. *J Infect Dis* 1999; 179:S431–5.
- [4] Pang G, Clancy R, Cong M, Ortega M, Zhigang R, Reeves G. Influenza virus inhibits lysozyme secretion by sputum neutrophils in subjects with chronic bronchial sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161: 718–22.
- [5] Leikina E, Delanoë-Ayari H, Melikov K i sur. Carbohydrate-binding molecules inhibit viral fusion and entry by crosslinking membrane glycoproteins. *Nat Immunol* 2005; 6:995–1001.
- [6] Hawgood S, Brown C, Edmondson J, Stumbaugh A i sur. Pulmonary collectins modulate strain-specific influenza A virus infection and host responses. *J Virol* 2004;78:8565–72.
- [7] Kopf M, Abel B, Gallimore A, Carroll M, Bachmann MF. Complement component C3 promotes T-cell priming and lung migration to control acute influenza virus infection. *Nat Med* 2002;8:373–8.
- [8] Barchet W, Krug A, Cella M i sur. Dendritic cells respond to influenza virus through TLR7- and PKR-independent pathways. *Eur J Immunol* 2005;35:236–42.
- [9] Katze MG, He Y, Gale M Jr. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* 2002;2:675–87.
- [10] Achdout H, Arnon TI, Markel G i sur. Enhanced recognition of human NK receptors after influenza virus infection. *J Immunol* 2003;171:915–23.
- [11] Cox RJ, Brokstad KA, Ogra P. Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. *Scand J Immunol* 2004;59:1–15.
- [12] Janeway CA, Travers P, Walport M, Schlomchik M. U: The Immune System in Health and Disease. 5. izd. New York: Garland Publishing, 2001.

- [13] Swain SL, Dutton RW, Woodland DL. T cell responses to influenza virus infection: effector and memory cells. *Viral Immunol* 2004;17:197–209.
- [14] Gotch F, McMichael A J, Smith G, Moss B. Identification of viral molecules recognized by influenza specific human cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1987;165:408–416.
- [15] Brown DM, Roman E, Swain SL. CD4 T cell responses to influenza infection. *Semin Immunol* 2004;16:171–7.
- [16] Baigent SJ, McCauley JW. Influenza type A in humans, mammals and birds: determinants of virus virulence, host-range and inter-species transmission. *Bioessays* 2003;25:657–71.
- [17] Munoz FM. Influenza virus infection in infancy and early childhood. *Paediatr Respir Rev* 2003;4:99–104.
- [18] Meyer KC. The role of immunity in susceptibility to respiratory infection in the aging lung. *Respir Physiol* 2001;128:23–31.
- [19] McElhaney JE. Overcoming the challenges of immunosenescence in the prevention of acute respiratory illness in older people. *Conn Med* 2003;67:469–74.
- [20] Fislava T, Kostolansky F. The factors of virulence of influenza A virus. *Acta virologica* 2005; 49:147– 157.
- [21] To KF, Chan PK, Chan KF i sur. Pathology of fatal human infection associated with avian influenza A H5N1 virus. *J Med Virol* 2001; 63:242–6.
- [22] Seo SH, Hoffmann E, Webster RG. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nat Med* 2002;8:950–4.
- [23] Yuen KY, Wong SSY. Human infection by avian influenza A H5N1. *Hong Kong Med J* 2005;11:189–99.
- [24] Lee DC, Cheung CY, Law AH, Mok CK, Peiris M, Lau AS. p38 mitogen-activated protein kinase-dependent hyperinduction of tumor necrosis factor alpha expression in response to avian influenza virus H5N1. *J Virol* 2005;79:10147–54.
- [25] Beigel JH, Farrar J, Han AM i sur. Writing Committee of the World Health Organization (WHO) Consultation on Human Influenza A/H5. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *N Engl J Med* 2005;353:1374–85.
- [26] Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G, Fanning TG. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* 2005;437:889–93.
- [27] Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV i sur. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science* 2005;310:77–80.
- [28] Le QM, Kiso M, Someya K, Sakai YT, Nguyen TH, Nguyen KH, Pham ND, Ngyen HH, Yamada S, Muramoto Y, Horimoto T, Takada A, Goto H, Suzuki T, Suzuki Y, Kawaoka Y. Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus. *Nature* 2005;437:1108–11.
- [29] de Jong MD, Tran TT, Truong HK, Vo MH, Smith GJ, Nguyen VC, Bach VC, Phan TQ, Do QH, Guan Y, Peiris JS, Tran TH, Farrar J. Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection. *N Engl J Med* 2005;353:2667–72.
- [30] Casetti MC, Couch R, Wood J, Pervikov Y. Report of meeting on the development of influenza vaccines with broad spectrum and long-lasting immune responses, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 26–27 February 2004. *Vaccine* 2005;23: 1529–33.
- [31] Subbarao K, Murphy BR, Fauci AS. Development of Effective Vaccines against Pandemic Influenza. *Immunity* 2006;24:5–9.
- [32] De Filette M, Min Jou W, Birkett A i sur. Universal influenza A vaccine: optimization of M2-based constructs. *Virology* 2005;337:149–61.
- [33] Thomas PG, Keating R, Hulse-Post DJ, Doherty PC. Cell-mediated protection in influenza infection. *Emerg Inf Dis* 2006;12:48–54.