

Artikel Asli/Original Article

**Vaksin Oral Universal untuk Jangkitan Influenza
(Universal Oral Vaccine for Influenza Infections)**

YAP WEI BOON, TOONG SENG TAN & SHARIFAH SYED HASSAN

ABSTRAK

Saban tahun, jangkitan virus influenza A telah mengakibatkan kadar kematian yang setinggi 300,000-500,000 di seluruh dunia. Biarpun terdapat agen dan vaksin anti-influenza yang berkesan terhadap jangkitan influenza, namun kadar mutasi yang tinggi dalam virus influenza A telah menyebabkan keberkesanan agen atau vaksin tersebut menurun secara mendadak dalam sesetengah individu. Keadaan ini dirumitkan lagi dengan beberapa batasan dalam proses penghasilan vaksin influenza yang sedia ada, antaranya tempoh produksi yang lama, kapasiti vaksin yang terhad dan kekurangan perlindungan bersilang terhadap subjenis virus influenza A yang berlainan. Bagi menyelesaikan isu-isu tersebut, pembangunan vaksin influenza universal berdasarkan antigen yang terpelihara seperti protein bukan struktur 1 (NSI) telah diusahakan. Protein NSI amat terpelihara dalam kesemua subjenis virus influenza A yang telah diketahui sehingga kini, banyak dihasilkan pada permukaan sel terjangkit dan berperanan penting untuk mengekalkan kevirulenan virus. Di samping itu, sel limfosit-T sitotoksik yang aktif terhadap NSI juga mampu mencegah peregangan jangkitan influenza dalam perumah. Bagi menghalang penyebaran jangkitan influenza dengan lebih efektif, imunisasi secara oral telah lama dicadangkan kerana kaedah ini adalah lebih mudah serta selamat malahan dapat menasarkankan virus influenza A bermula dari laluan kemasukannya. Lactobacillus telah banyak dikaji peranannya sebagai pembawa bakteria dalam pembangunan vaksin oral disebabkan ciri-ciri probiotiknya yang signifikan. Antaranya, dapat merangsang tindak balas imun di lapisan mukosa oral dan saluran pernafasan, kolonisasi tinggi pada permukaan mukosa serta keadjuvanan semula jadi yang tinggi. Dengan itu, vaksin influenza universal oral yang dihasilkan dengan menggunakan NSI dan Lactobacillus seharusnya dikaji secara terperinci lagi dalam reka bentuk vaksin oral influenza.

Kata kunci: Virus influenza; NSI; vaksin oral; probiotik; lactobacillus

ABSTRACT

Each year, influenza A infections have caused tremendous death rate as high as 300,000-500,000 globally. Although there are effective anti-influenza agents and vaccines, high mutational rate among influenza A viruses renders dramatic decline in the effectiveness of anti-influenza agents or vaccines in certain individuals. The situation is further complicated by limitations in influenza vaccine production, for instance, long production period, limited vaccine capacity and lack of cross-protection against various influenza A virus strains. To solve these issues, development of universal influenza vaccine based on conserved antigens such as non-structural protein 1 (NSI) has been endeavoured. NSI protein is highly conserved in all influenza A virus strains known by far, produced abundantly on infected cell surfaces and responsible for maintaining virulence. Furthermore, cytotoxic T-lymphocytes that are active against NSI were also reported to be able to avoid shedding of influenza in hosts. To better inhibit influenza infections, oral immunization has long been proposed due to feasibility of this method to be implemented and safer for recipients while able to target influenza A viruses from the entry point. Lactobacillus has been vastly studied for its roles as bacterial carrier in oral vaccine development due to its significant probiotic properties. For examples, stimulation of immune responses in oral and airway mucosal layers, high colonization in oral and airway mucosal layers and great natural adjuvant effects. In this light, influenza universal oral vaccine developed using NSI dan Lactobacillus should be further studied in influenza oral vaccine design.

Keywords: Influenza viruses; NSI; oral vaccines; probiotic; lactobacillus

PENGENALAN

Wabak influenza A adalah antara jangkitan virus yang merisaukan warga dunia kerana jangkitan ini meragut 300,000 hingga 500,000 nyawa pada setiap tahun terutamanya dalam kalangan mereka yang berusia 65

tahun ke atas (Haq & McElhaney 2014). Selain pandemik influenza H1N1, H2N2, dan H3N2 yang dilaporkan pada abad yang lepas, pandemik influenza A H1N1 yang terbaru berlaku pada tahun 2009 dengan kadar kematian setinggi 10% dalam kalangan individu yang mempunyai kekurangan dalam sistem imun, contohnya warga emas, kanak-kanak

kecil dan ibu mengandung (Soema et al. 2015). Risiko berlakunya wabak dan pandemik influenza A bertambah dengan transmisi virus influenza A burung (AIV) H5N1 berkepatogenan tinggi (highly pathogenic avian influenza, HPAI) secara langsung daripada burung ke manusia. Transmisi AIV H5N1 telah dilaporkan buat pertama kali di Hong Kong pada tahun 1997 dan kemudiannya telah merebak ke negara-negara yang lain di Asia, Timur Tengah, Afrika dan Eropah. Virus ini bukan sahaja mengakibatkan penyakit dan kematian dalam kalangan burung domestik dan liar, tetapi juga dalam kalangan manusia yang terdedah kepadanya (Peiris et al. 2007). Sehingga bulan Mei 2016, Organisasi Kesihatan Sedunia (World Health Organization, WHO) telah merekodkan 850 kes H5N1 dengan 449 kematian sejak tahun 2003 di 15 negara (WHO 2016). Kadar kematian akibat jangkitan H5N1 adalah melebihi 50%. Hal ini memerihalkan kepentingan untuk membangunkan langkah pencegahan yang efektif bagi mengelakkan perebakan dan wabak jangkitan virus influenza A. Vaksinasi merupakan strategi yang paling berkesan dalam mencegah perebakan wabak influenza A. Namun, vaksin influenza yang sedia ada mempunyai beberapa batasan atau isu-isu penghasilan kritikal. Antaranya adalah masa penghasilan selama 6-8 bulan (Lu et al. 2014), kapasiti vaksin yang terhad, keberkesanan yang rendah dalam individu tertentu, dan kekurangan perlindungan bersilang terhadap jangkitan subjenis virus influenza A yang tidak termasuk dalam vaksin influenza (Soema et al. 2015).

Perkembangan pengetahuan mengenai epitop virus influenza yang terpelihara telah memacu reka cipta vaksin influenza ke arah pembangunan vaksin universal (Stanekova & Vareckova 2010). Vaksin universal mampu merangsang sistem imun bagi menghasilkan perlindungan bersilang yang meluas dalam penerima. Salah satu epitop terpelihara virus influenza yang telah dikenal pasti adalah protein bukan struktur 1 (non-structural protein 1, NS1) terutamanya pada bahagian isyarat eksport nuklear (*nuclear export signal*, NES) yang bertempat di antara asid amino 138–147 (Tynell, Melen & Julkunen 2014). Protein NS1 didapati terpelihara dalam kesemua subjenis virus influenza A yang telah diketahui sehingga kini (Tynell et al. 2014). Protein tersebut dihasilkan dalam kuantiti yang banyak (Mustapha et al. 2011) pada permukaan sel terjangkit pada fasa awal (Zhirnov et al. 2007) malahan mampu menjalankan pelbagai fungsi biologi bagi mengekalkan kevirulenan virus tersebut dalam perumah yang dijangkiti. Selain dihasilkan dengan banyak pada permukaan sel yang terjangkit, Hutchinson et al. (2014) telah melaporkan kehadiran protein NS1 yang sedikit dalam partikel virus yang dituliskan. Hasil kajian ini mencadangkan protein NS1 mungkin adalah komponen dalaman virus influenza tetapi dalam kuantiti yang kecil. Oleh yang demikian, antibodi yang menyasarkan NS1 protein dapat menghapuskan sel terjangkit dan partikel virus influenza bagi mengawal perebakan wabak influenza.

Sehingga kini, tidak banyak kajian saintifik yang menjurus kepada potensi protein NS1 sebagai calon

vaksin universal. Akan tetapi, Zhirnov et al. (2007) telah melaporkan penambahan plasmid yang mengekodkan NS1 dalam satu vaksin gabungan DNA NP (nukleoprotein) dan M1 (matriks 1) mampu meningkatkan keberkesanan vaksin tersebut dalam tikus. Selain itu, tindak balas limfosit-T sitotoksik (cytotoxic T lymphocytes, CTL) terhadap NS1 membuktikan kebolehan protein tersebut dalam merangsang keimunan selular anti-NS1 (Boon et al. 2002). Oleh itu, protein NS1 sesuai dijadikan calon antigen dalam pembangunan vaksin influenza universal.

Vaksinasi secara oral telah lama dicadangkan untuk jangkitan influenza kerana kaedah ini adalah lebih mudah serta selamat berbanding dengan cara suntikan. Pemberian vaksin influenza melalui laluan oral bukan sahaja dapat merangsang keimunan mukosa dan malahan juga dapat mengelakkan risiko infeksi oportunistik serta iatrogenik. Lebih penting, vaksinasi secara oral memberi perlindungan terhadap virus influenza bermula dari laluan kemasukannya (Quan et al. 2012). Seseengah strain bakteria asid laktik (lactic acid bacteria, LAB) merupakan calon yang sesuai bagi reka cipta vaksin oral yang efektif memandangkan statusnya sebagai komensal semula jadi bukan invasif dalam saluran gastrousus di samping mempunyai rintangan tinggi terhadap asid gastrik (Yap et al. 2015) serta manfaatnya sebagai probiotik (WGO 2009).

Sehingga kini, perkembangan dalam biologi molekul LAB telah memungkinkan pembangunan strain LAB rekombinan yang dapat mengekspresikan epitop-epitop yang antigenik justeru mampu memberi perlindungan keimunan terhadap jangkitan AIV di mukosa dan saluran pernafasan (Villena et al. 2011). Baru-baru ini, penggunaan LAB sebagai sistem penghantaran antigen telah mendapat sambutan yang hangat. Sistem penghantaran tersebut memiliki kelebihan berbanding dengan vaksin tradisional kerana kolonisasi LAB pada saluran pernafasan, saluran gastrousus, saluran kencing dan sel epitelium mukosa yang lain mampu merangsang sistem keimunan mukosa dengan efektif (Hongying et al. 2014). Lapisan peptidoglikan di permukaan luar beberapa strain *Lactobacillus* mempunyai ciri peningkatan keimunan (immunoadjuvanticity) secara semula jadi (Del Rio et al. 2008). Dengan itu, imuniti yang lebih tinggi terhadap antigen yang dipamerkan pada permukaan sel *Lactobacillus* dapat diaruh (Olivares et al. 2007). Hal ini membolehkan vaksin oral universal influenza dibangunkan dengan menghasilkan antigen terpelihara seperti NS1 pada permukaan luar LAB.

EPIDEMIK DAN PANDEMIK INFLUENZA

Virus influenza A yang merangkumi AIV H5N1 berasal dari famili *Orthomyxoviridae* terbahagi kepada tiga jenis yang utama, iaitu jenis A, B, dan C. Hanya virus influenza jenis A dan B yang memberi impak signifikan kepada kesihatan manusia (Belshan et al. 2014). Virus influenza jenis A boleh dikategorikan secara lanjut berdasarkan komposisi glikoprotein permukaan, iaitu

haemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA). Sehingga kini, sebanyak 17 subjenis HA (H1–H17) dan 10 subjenis NA (N1–N10) telah dikenal pasti (Iqbal et al. 2014). Variasi dalam glikoprotein HA dan NA adalah disebabkan oleh perubahan genetik secara berterusan pada gen HA dan NA virus influenza jenis A. Antara perubahan genetik yang acap kali berlaku pada kedua-dua gen tersebut termasuk hanyutan antigen (antigenic drift) yang melibatkan mutasi titik yang mengakibatkan perubahan kecil pada antigen HA atau NA tanpa menyebabkan kemunculan subjenis virus yang baru. Namun, perubahan ini membolehkan virus influenza melepaskan diri daripada pengawasan sistem imun perumah dan adalah satu-satunya sebab yang membawa kepada epidemik dan wabak influenza tahunan. Perubahan yang satu lagi adalah anjakan antigen (antigenic shift) yang melibatkan pertukaran bersilang antara gen HA dan/atau NA daripada subjenis virus yang berlainan. Keadaan ini menyebabkan perubahan signifikan pada gen HA atau NA sehingga menyebabkan kemunculan subjenis virus influenza A yang baru (Eagles et al. 2009). Mutasi seumpama ini susah untuk diramalkan malahan menyebabkan usaha penghasilan vaksin tergendala atas sebab gen HA dan NA yang pelbagai. Virus influenza jenis A sangat rentan kepada anjakan antigen kerana kebolehan polimerase RNA virus yang rendah dalam membetulkan mutasi dalam jujukan RNA virus. Disebabkan kemunculan subjenis virus yang baru, mutasi secara anjakan antigen berpotensi mencetuskan pandemik jikalau subjenis virus yang baru mampu mengakibatkan jangkitan dengan meluas dalam kalangan manusia (Carr 2012).

Setiap tahun, epidemik influenza A mengakibatkan 3.5 juta kes jangkitan dan 300,000-500,000 kematian. Risiko jangkitan dan kematian adalah tertinggi dalam kalangan warga emas yang berumur lebih daripada 65 tahun, kanak-kanak yang berumur kurang daripada 2 tahun, dan individu dengan tahap kesihatan yang rendah (CDC 2005). Hanyutan antigen akibat daripada mutasi kecil-kecilan dan berlanjutan pada antigen virus influenza A merupakan asas kepada kejadian epidemik influenza pada setiap atau 2 tahun (Kamps & Reyes-Teran 2006). Kejadian yang lebih merunsingkan adalah pandemik influenza baru. Kebanyakan ahli virologi influenza berpendapat bahawa pandemik influenza akan berlaku, persoalannya bila wabak pandemik akan berlaku (Fiers et al. 2009). Pandemik yang terkini berlaku pada April 2009. Punca pandemik tersebut berasal dari wilayah selatan Amerika Syarikat. Pandemik influenza tersebut berjaya merebak dengan laju dan meluas dalam kalangan manusia dan menyebabkan penularan tanpa kawalan di Mexico sejak awal bulan Mac pada tahun yang sama. Pada 11 Jun 2009, WHO mengisytiharkan pandemik influenza A (H1N1)/2009 memandangkan penebaran telah dilaporkan di lebih daripada 70 negara (Punpanich & Chotpitayasonondh 2012).

Sebelum pandemik A(H1N1)/2009, tiga kejadian pandemik influenza yang serius telah berlaku pada tahun 1918, 1957 dan 1968 yang meragut beribu juta nyawa. Ketiga-tiga pandemik ini adalah disebabkan oleh virus

influenza jenis A. Pandemik pada tahun 1918 yang lebih dikenali sebagai “Spanish flu” diakibatkan oleh virus H1N1 yang berjaya meragut lebih kurang 100 juta nyawa manusia atas sebab ketiadaan pertahanan dalam manusia terhadap virus dan kevirulenan virus yang tinggi. Pandemik pada tahun 1957 atau “Asian influenza” yang dibawa oleh virus H2N2 yang telah terhasil akibat pertukaran gen secara bersilang (HA2, NA2 dan PB1) dengan virus influenza strain H1N1 (De Jong & Hien 2006). Manakala virus H3N2 yang menyebabkan “Hong Kong Influenza” pada tahun 1968 mewarisi dua gen (HA3 dan PB1) daripada strain H2N2 (Lee & Saif 2009).

Selain virus influenza A manusia, menurut Peiris, De Jong & Guan (2007), virus *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) strain H5N1 yang berciri *panzootic* dalam haiwan ternakan juga telah menular dan mampu mengancam kesihatan haiwan serta manusia. Biarpun penebaran H5N1 tidak lagi berlaku antara manusia dengan manusia, namun kajian tersebut juga menyatakan potensi AIV HPAI H5N1 sebagai ancaman pandemik yang seterusnya kerana kepatogenan virus HPAI H5N1 yang tinggi. Jangkitan H5N1 dapat menimbulkan kadar kematian setinggi 50% sekiranya virus tersebut berjaya menempuhi penghalang spesies (species barrier) antara haiwan ternakan dengan manusia dan menyebabkan jangkitan dalam manusia (Lam et al. 2008). Setelah dilaporkan pada pertama kali di Hong Kong pada tahun 1997 dengan kadar kematian lebih kurang 30%, penularan jangkitan AIV H5N1 dalam kalangan manusia telah dilaporkan sekali lagi pada tahun 2003 dengan kadar kematian yang jauh lebih tinggi iaitu melebihi 50% (Lam et al. 2008). Semenjak itu, wabak influenza burung telah kerap dilaporkan dalam industri penternakan ayam itik terutamanya di Asia Tenggara. Oleh sebab yang demikian, AIV H5N1 juga perlu diberi lebih perhatian bagi meramal kejadian pandemik yang seterusnya.

PENYEBARAN WABAK AIV H5N1 DI MALAYSIA

Burung akuatik telah dikenal pasti sebagai perumah semula jadi bagi kesemua virus influenza jenis A termasuk AIV H5N1 (Carr 2012). AIV H5N1 bukan sahaja dapat menjangkiti burung dan manusia, haiwan lain seperti primat, ayam, khinzir, feret, kuda, anjing laut dan ikan paus turut boleh terjangkit, justeru memberi impak ekonomi yang teruk kepada industri peternakan haiwan (James et al. 2017). Misalnya, negara-negara yang diserang wabak influenza A H5N1 telah mengalami kerugian ekonomi yang teruk atas sebab kemerosotan perdagangan ayam itik di peringkat domestik dan antarabangsa (Tee et al. 2009). Wabak HPAI subjenis H5N1 pertama kali dilaporkan di Malaysia pada bulan Ogos tahun 2004 di sebuah kampung yang terletak di sempadan antara Kelantan dengan Thailand. Pada bulan Februari 2006, wabak HPAI H5N1 muncul semula dan seterusnya menjejaskan kawasan yang lebih luas iaitu kampung-kampung di sekitar Kuala Lumpur, Perak dan Pulau Pinang serta pantai barat Semenanjung

Malaysia. Analisis filogenetik yang dijalankan ke atas AIV H5N1 yang diasingkan daripada ternakan terjangkit mencadangkan virus tersebut berasal dari negara Indonesia dan China (Tee et al. 2009). Wabak yang berikutnya berlaku pada 2 Jun 2007 di negeri Selangor. Baru-baru ini, wabak H5N1 telah dilaporkan dalam kalangan ayam ternakan pada bulan Mac 2017 di beberapa kawasan di Kelantan, Malaysia (CIDRAP 2017). Punca wabak tersebut telah dikenal pasti dan didapati sama dengan wabak yang dilaporkan sebelum ini iaitu melalui perdagangan ayam itik serta produknya dan pengendalian haiwan ternakan yang telah dijangkiti (Eagles et al. 2009; WHO 2012). Walaupun kematian manusia yang disebabkan oleh jangkitan AIV H5N1 masih tidak dilaporkan di Malaysia, namun kejadian wabak influenza A H5N1 yang dicatatkan sehingga kini menjelaskan keperluan dan kepentingan untuk mengambil langkah pencegahan yang lebih serius untuk membendung perebakan wabak influenza H5N1 di Malaysia sebelum terlambat.

Organisasi Kesihatan Haiwan Sedunia (World Organization for Animal Health, OIE) (2012) telah memerihalkan kejadian AIV yang harus dilaporkan (*notifiable form of avian influenza*, NAI) adalah sebarang kes jangkitan oleh virus influenza jenis A subjenis H5 atau H7 dalam haiwan ternakan, ataupun oleh virus AVI yang mempunyai indeks kepatogenan intravena (intravenous pathogenicity index, IVPI) melebihi 1.2 (atau sebagai alternatif, melibatkan sekurang-kurangnya 75% mortaliti). NAI boleh dibahagikan kepada *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) dan *low pathogenic avian influenza* (LPAI).

Perbezaan utama antara virus LPAI dengan HPAI ialah replikasi LPAI banyak berlaku secara setempat manakala HPAI pula melibatkan replikasi virus secara sistemik. Tapak replikasi virus LPAI terhad kepada tisu respiratori atau usus setempat. Maka, jangkitan virus LPAI adalah kurang serius. Sebaliknya, virus HPAI boleh menjangkiti pelbagai jenis sel perumah maka mampu mengakibatkan penyakit sistemik yang membawa maut (Lee & Saif 2009). Kini, virus HPAI semula jadi terdiri daripada subjenis H5 dan H7 sahaja. Oleh sebab kajian genomik telah membuktikan virus HPAI muncul akibat mutasi genetik dalam virus LPAI subjenis H5 dan H7, maka semua LPAI subjenis H5 dan H7 berpotensi menjadi sangat patogenik melalui mutasi gen dan juga harus dikategorikan dalam virus NAI (OIE 2012).

HPAI subjenis H5N1 yang lazim menjangkiti ayam itik ternakan telah dilaporkan mampu menembusi halangan antara spesies lalu menjangkiti haiwan mamalia termasuk manusia. Hal ini banyak disebabkan oleh mutasi pada gen HA yang telah mengubah afinitinya pada reseptor asid sialik (SA) α -2,3 (yang terdapat dalam sel spesies avian) ke SA α -2,6 (yang terdapat dalam sel manusia) (Peiris et al. 2007). Ciri-ciri klinikal jangkitan H5N1 hampir sama dengan influenza umum dalam manusia, antaranya ialah demam, batuk, dan sesak nafas dengan komplikasi penyakit pneumonia. Maka jangkitan virus H5N1 dalam manusia sukar dibezakan daripada jangkitan virus biasa (De Jong

& Hien 2006). Komplikasi utama jangkitan virus H5N1 berlaku pada alveoli, seterusnya membolehkan jangkitan bakteria sekunder berlaku dan menyebabkan pneumonia. Manakala komplikasi di luar tisu respiratori termasuklah ensefalopati, miokarditis dan miopati yang berlaku sekalisekala (Kuiken et al. 2008). Gejala bukan respiratori yang kerap ditemui dalam pesakit jangkitan H5N1 termasuklah diare, muntah dan sakit perut. Inflamasi pada sistem saraf pusat turut diperhatikan dalam sesetengah pesakit jangkitan H5N1 (Peiris et al. 2007).

VAKSIN INFLUENZA

Seperti jangkitan virus yang lain, vaksinasi telah dikenal pasti sebagai langkah pencegahan yang paling berkesan bagi membendung wabak influenza (Soema 2015). Dalam kajian Peiris, De Jong dan Guan (2007) dan De Jong dan Hien (2006), mereka telah mengulas keberkesanan tiga strategi asas untuk mengawal dan membasmi wabak influenza. Antaranya ialah rawatan dengan menggunakan anti-virus, pengawalan jangkitan dan pencegahan serta yang paling penting sekali, program vaksinasi. Pada masa kini, terdapat dua kelas ubat antivirus influenza yang boleh didapati di pasaran iaitu perencat saluran ion M2 seperti Amantadine dan Rimantadine, serta perencat neuraminidase seperti Oseltamivir dan Zanamivir (De Jong & Hien 2006). Namun, mutasi virus influenza yang kian menjadi baru-baru ini telah menyebabkannya rintang terhadap antivirus tersebut (Cross et al. 2012). Bagi vaksinasi pula, vaksin influenza yang berlesen pada masa sekarang adalah berpandukan WHO dan dihasilkan berdasarkan protein hemagglutinin (HA) sebagai antigen yang dominan. Vaksin influenza wujud dalam pelbagai bentuk, sama ada vaksin virus nyahaktif (mati), virus berpisah, subunit atau vaksin virus hidup (Fiers et al. 2009). Sebanyak 250 juta dos vaksin influenza dihasilkan setiap tahun dengan keberkesanan kira-kira 60-90% dalam kalangan kanak-kanak dan orang dewasa. Walaupun kurang berkesan dalam kalangan orang tua, vaksin influenza masih mampu mencegah sebanyak 80% kadar kematian dalam kumpulan umur tersebut (De Filette et al. 2005).

Bagi menghadapi influenza bermusim 2016-2017, vaksin nyahaktif telah tersedia dalam formulasi trivalen (IIV3) dan juga quadrivalen (IIV4). Vaksin influenza rekombinan juga terdapat dalam formulasi trivalen (RIV3). Manakala bagi vaksin influenza hidup yang dilemahkan (LAIV4), *Advisory Committee on Immunization Practices* (ACIP) U.S mencadangkan vaksin tersebut tidak digunakan untuk musim sekarang memandangkan keberkesanan yang rendah terhadap influenza A(H1N1) pdm09 pada tahun 2013-2014 dan 2015-2016. Strain virus yang termasuk dalam formulasi vaksin trivalen musim adalah virus A/California/7/2009 (H1N1)-like, A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2)-like, dan virus B/Brisbane/60/2008-like (keturunan Victoria). Vaksin quadrivalen pula akan ada satu strain virus influenza B tambahan, iaitu virus B/

Phuket/3073/2013-like (keturunan Yamagata) (Grohskopf et al. 2016).

Vaksin influenza merangsangkan penghasilan antibodi dalam tubuh penerima rata-rata dua minggu selepas vaksinasi. Antibodi tersebut memberi perlindungan terhadap jangkitan oleh subjenis virus influenza yang termasuk dalam formulasi vaksin (CDC 2016). Dengan itu, vaksinasi merupakan cara yang paling efektif untuk mengurangkan impak epidemik dan juga pandemik influenza (Subbarao & Matsuoka 2013). Tambahan lagi, strategi tersebut juga lebih efektif dari segi kos berbanding dengan strategi pembasmian virus (virus eradication) dalam pengawalan jangkitan virus influenza (Lee et al. 2009).

LIMITASI DALAM VAKSIN INFLUENZA KONVENSIONAL

Vaksin influenza secara tradisinya dihasilkan dengan menggunakan telur ayam berembrio (Aggarwal et al. 2011; Youil et al. 2004). Selain masalah dari segi ketersediaan pada waktu pandemik influenza (Murakami et al. 2008), pengkulturan virus berasaskan telur berembrio juga berkebarangkalian mengandungi mikroorganisma berbahaya dan residu endotoksin (Wanasawaeng et al. 2009). Menurut Du et al. (2010), vaksin konvensional mempunyai beberapa limitasi, antaranya termasuklah (1) kitaran penghasilan yang panjang dan rumit; (2) kapasiti penghasilan yang terhad; (3) berpontensi mengakibatkan alahan dalam individu yang alergi pada produk telur; (4) keimmunogenan yang terhad dan hanya dapat merangsang respons peneutralan terhadap subjenis virus yang digunakan dalam formulasi vaksin.

Pemilihan subjenis virus dalam reka bentuk dan penghasilan vaksin influenza bermusim bergantung pada pengawasan secara global oleh WHO (Subbarao & Matsuoka 2013). Selama 10 tahun ini, sebanyak 88% ramalan subjenis virus yang digunakan dalam penghasilan vaksin adalah selari dengan subjenis virus influenza yang menular. Ramalan yang tidak tepat akan mempengaruhi keberkesanan vaksin (De Filette et al. 2005). Tambahan lagi, mutasi berterusan dalam virus influenza membolehkan virus melepaskan diri daripada pengawasan sistem keimunan dan seterusnya mencetuskan wabak tahunan dan pandemik yang berlaku sekali-sekala.

Kini, hampir semua vaksin influenza manusia yang ada di pasaran adalah berdasarkan glikoprotein permukaan HA (Zou et al. 2005). Namun, virus influenza mempunyai kadar mutasi yang tinggi, iaitu sebanyak 0.5×10^{-3} penggantian asid amino bagi seluruh genom manakala $1.9-3.0 \times 10^{-3}$ penggantian asid amino bagi gen HA sahaja pada setiap tahun. (Brown 2000). Mutasi pada gen HA menyebabkan wabak influenza bermusim yang tidak berkesudahan dan ancaman pandemik yang berlaku sekali-sekala yang sangat membebaskan kerana kedua-duanya melibatkan tanggungan ekonomi serta kos perubatan yang tinggi. Sehubungan itu, adalah penting untuk membangunkan

strategi pencegahan wabak influenza yang lebih efektif bagi mengatasi semua kekangan yang sedia ada. Salah satu strategi yang telah dicadangkan adalah pembangunan vaksin universal (Fiers et al. 2009).

VAKSIN UNIVERSAL INFLUENZA

Vaksin universal influenza ditakrifkan sebagai vaksin yang dapat memberi perlindungan imun terhadap semua subjenis virus influenza, termasuklah subjenis baru yang boleh menyebabkan pandemik. Sehubungan itu, perkembangan vaksin universal influenza kebiasaannya melibatkan antigen yang terpelihara dalam kalangan kesemua subjenis virus influenza malahan jarang mengalami mutasi genetik yang mendatangkan perubahan keantigenan (Subbarao & Matsuoka 2013). Oleh sebab yang demikian, vaksin universal influenza seharusnya dapat menawarkan perlindungan bersilang yang lebih meluas berbanding dengan vaksin yang sedia ada. Dengan ini, formula vaksin influenza tidak perlu diperbaharui pada tiap-tiap tahun (Subbarao & Matsuoka 2013). Menurut Du et al. (2010), vaksin universal masih di bawah pembangunan dan belum diperkenalkan lagi di pasaran. Pada masa sekarang, kebanyakan vaksin influenza universal dibangunkan berdasarkan jujukan asid amino yang terpelihara pada protein virus M2e, HA (Du et al. 2010), M1, NA dan NP (Subbarao & Matsuoka 2013). Walaupun keselamatan dan imunogenisiti vaksin universal yang berasaskan M2e telah dikaji dalam fasa 1 percubaan klinikal (Shaw 2012), efikasi vaksin tersebut pada manusia adalah rendah dan keberkesannya untuk mencegah jangkitan influenza dalam manusia masih kurang jelas. Hal ini kerana M2e merupakan antigen yang mempunyai tahap keimmunogenan yang rendah (Schotsaert et al. 2009). Justeru itu, keupayaan antigen terpelihara yang lain seperti NS1 sebagai vaksin universal seharusnya dikaji atas sebab kebolehan untuk merangsang sistem imun manusia dan haiwan (Yamada et al. 1985; Kuwano et al. 1989). Tambahan pula, kajian tentang potensi NS1 sebagai vaksin universal masih jarang diterokai.

PROTEIN BUKAN STRUKTUR 1 (NS1) DAN POTENSINYA SEBAGAI VAKSIN INFLUENZA UNIVERSAL

Protein NS1 dikodkan oleh RNA segmen ke-8 virus influenza jenis A yang turut mengekodkan protein eksport nuklear (nuclear export protein, NEP/NS2). NS1 ditranslasikan daripada salinan mRNA yang tidak mengalami pemecahan pasca-transkripsi manakala NEP/NS2 pula ialah produk daripada proses translasi mRNA yang mengalami pemecahan pasca-transkripsi (Robb et al. 2010). Protein NS1 yang terdiri daripada 230–237 asid amino merupakan protein yang sangat terpelihara dalam kalangan virus influenza jenis A (Engel 2013). Protein ini

diekspresikan dalam jumlah yang banyak oleh sel terjangkit (Ong & Chan 2012) pada peringkat awal replikasi virus (Zhirnov et al. 2007). Protein NS1 memiliki dua domain berfungsi iaitu domain pengikat dsRNA (dsRNA-binding domain) (RBD) dan domain efektor (ED) yang berinteraksi dengan molekul intraselular serta ekstraselular.

RBD (1–73 residu asid amino) yang terletak pada penghujung amino (*N-terminus*) berfungsi untuk menghalang sintesis interferon (IFN) jenis 1 dan seterusnya merencatkan tindak balas keimunan perumah. ED (74–230 residu asid amino) yang terletak pada penghujung karboksi (*C-terminus*) pula berfungsi untuk mencegah aktiviti poli-adenilasi mRNA perumah, sebagai perantara yang mengawal atur interaksi protein NS1 dengan protein sel perumah dan menstabilkan RBD (Dundon & Capua 2009; Ong & Chan 2012).

Penghasilan protein NS1 pada permukaan sel terjangkit buat pertama kali dilaporkan oleh Shaw, Lamon & Compans (1981). Protein NS1 tidak terbungkus dalam struktur virion maka dikenali sebagai protein bukan struktur (non-structural) 1. Namun, Hutchinson et al. (2014) telah melaporkan kewujudan protein NS1 dalam kuantiti yang sedikit dalam partikel virus yang dituliskan. Justeru, hasil kajian ini mencadangkan protein NS1 juga bermungkinan merupakan komponen dalaman virus influenza, namun pemerhatian ini memerlukan kajian selanjutnya untuk membuktikan kesahihannya.

Protein NS1 virus influenza jenis A telah banyak dikaji berkenaan peranannya dalam mengawal atur respons keimunan semula jadi perumah (Hale et al. 2008) serta replikasi virus (Engel 2013). Protein NS1 sememangnya merupakan protein yang mempunyai berbilang fungsi. Antara kitar replikasi virus dan tindak balas keimunan perumah yang dikawal atur oleh protein NS1 termasuk (1) sintesis, pemprosesan dan translasi RNA virus; (2) morfogenesis untuk membentuk virion influenza matang; (3) pengaktifan tapak jalan *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K) bagi mengelakkan apoptosis dalam perumah; serta (4) meningkatkan kepatogenan virus (bergantung pada strain) dalam perumah.

Atas sebab fungsi-fungsi pengawalaturan demikian, protein NS1 telah dicadangkan untuk dimasukkan dalam reka bentuk vaksin virus influenza hidup yang telah dilemahkan (live attenuated influenza vaccine, LAIV) sejak kebelakangan ini. Menurut Richt & Garcia-Sastre (2009), virus influenza A boleh dilemahkan dengan memperkenalkan mutasi pada jujukan gen *NS1* melalui teknik genetik berbalik (reverse genetics). Subjenis-subjenis virus influenza yang membawa gen *NS1* yang bermutasi mempunyai potensi untuk dibangunkan sebagai LAIV kerana replikasi dan kevirulenan subjenis virus tersebut adalah terbatas dalam sel perumah tanpa NS1 yang sempurna. Pemberian LAIV tersebut secara intranasal dilaporkan dapat merangsang respons keimunan humoral dan selular yang kuat dalam model haiwan (Richt & Garcia-Sastre 2009; Steel et al. 2009). Selain itu, ubat antivirus yang bertujuan untuk merencatkan fungsi NS1

juga semakin mendapat perhatian baru-baru ini kerana agen antivirus sebegini berpotensi sebagai intervensi terapeutik yang terjamin (Engel 2013).

Seperkara lagi, sel limfosit-T sitotoksik (cytotoxic T-lymphocytes, CTLs) yang kerap dikesan dalam manusia yang terjangkit oleh virus influenza menyasar epitop terpelihara pada antigen virus influenza (Jameson, Cruz & Ennis 1998). CTLs mengecam epitop terpelihara yang dipersembahkan pada molekul MHC kelas I oleh sel terjangkit dan seterusnya diaktifkan untuk membunuh sel terjangkit bagi membatasi penyebaran virus influenza dalam perumah (Assarsson et al. 2008; Stanekova & Vareckova 2010). Oleh sebab protein NS1 adalah lebih terpelihara dalam kalangan virus influenza strain A berbanding dengan protein luaran seperti HA dan NA, maka CTLs yang terhasil mempunyai reaktiviti bersilang terhadap pelbagai subjenis AIV. Tambahan pula, CTLs memori yang tinggal bersama perumah setelah sembuh daripada jangkitan lepas dapat beraksi dengan serta-merta apabila perumah dijangkiti semula oleh virus influenza biarpun subjenis virus tersebut adalah berlainan daripada virus dalam jangkitan lepas (Shaw, Lamon & Compans 1981). Schulman & Kilburne (1965) telah melaporkan perlindungan bersilang sebegini secara *in vivo* dalam tikus yang sebelumnya dijangkiti oleh virus H1N1. Apabila tikus tersebut dijangkiti semula dengan virus H2N2, replikasi virus H2N2 dalam tikus tersebut telah menurun dengan drastik. Kajian oleh Yamada et al. (1985) melaporkan protein hibrid yang terdiri daripada gabungan 81 asid amino pertama NS1 dengan protein HA2 daripada virus influenza A/PR/8/34 (H1N1) (protein c13) dapat merangsang respons CTL secara *in vitro*. Manakala protein tunggal HA2 dan protein tunggal HA tidak dapat merangsang respons CTL secara berkesan. Kajian yang selanjutnya turut mengesahkan protein c13 dapat merangsang respons CTL terhadap virus influenza subjenis H1 dan H2 secara *in vivo* (Kuwano et al. 1989). Hal ini memerihalkan kepentingan protein terpelihara seperti NS1 dalam reka bentuk vaksin universal yang menyasarkan keimunan CTL.

Vaksin yang sedia ada di pasaran sekarang tertumpu pada protein HA dan NA virus influenza. Namun, hanyutan antigen yang berterusan pada glikoprotein permukaan tersebut membolehkan virus influenza mengelakkan diri daripada sasaran antibodi. Oleh itu, keberkesanan vaksin terjejas dan akibatnya perlu diformulasi semula bagi setiap tahun. Antigen yang terpelihara dalam kalangan subjenis virus dan mampu merangsang tindak balas CTLs menawarkan pendekatan alternatif dalam reka bentuk vaksin influenza universal (Jameson et al. 1998). Keterukan jangkitan influenza dapat diringankan jika seseorang individu mempunyai keimunan sel limfosit-T yang lengkap berbanding dengan individu yang kekurangan keimunan CTLs yang spesifik terhadap virus influenza (Stanekova & Vareckova 2010). Sebagai contoh, kekurangan CTLs dalam tikus terjangkit menyebabkan titer virus influenza meningkat dalam paru-paru. Hal ini mempercepatkan patogenesis penyakit dan akhirnya kematian (Liang et al. 1994).

PEMBANGUNAN VAKSIN ORAL INFLUENZA
DENGAN MENGGUNAKAN *LACTOBACILLUS*
SEBAGAI PEMBAWA BAKTERIA (*BACTERIAL*
CARRIER)

Bagi program vaksinasi secara besar-besaran yang melibatkan subjek dalam kuantiti yang ramai, ataupun program vaksinasi dalam bidang veterinar, pemberian vaksin melalui laluan oral adalah lebih mudah dan praktikal berbanding dengan laluan penghantaran yang lain. Contohnya, sesetengah vaksin oral haiwan telah diperkenalkan dan diberi sebagai komponen makanan untuk lembu, ayam, dan ikan ternakan (Russell & Mestecky 2015). Penggunaan vaksin oral juga relevan apabila diaplikasikan di negara-negara mundur kerana ia lebih murah, tidak memerlukan jarum suntikan atau kakitangan penuh bertauliah (Silin et al. 2007). Setakat ini, kebanyakan vaksin oral yang telah dilesenkan bagi kegunaan manusia dan haiwan disediakan dalam bentuk patogen yang telah dilemahkan (attenuated). Vaksin tersebut mampu bereplikasi dalam tisu mukosa dan merangsang tindak balas imun secara berterusan dalam tempoh yang singkat. Walaupun begitu, risiko penggunaan vaksin tersebut seperti patogen kembali ke jenis yang virulen dalam sesetengah populasi sasaran, contohnya pesakit imunokompromi telah banyak dipertikaikan (Silin et al. 2007).

Oleh sebab yang demikian, pembangunan vaksin oral dalam bentuk nyahaktif (killed) telah diusahakan kerana kesannya yang kurang berbahaya, namun alahan mungkin berlaku kerana kandungan antigen yang tinggi. Tambahan pula, keberkesanan vaksin tersebut juga sering diragui atas sebab penyahaktifan antigen (Silin et al. 2007). Untuk memastikan vaksin oral yang dihasilkan dapat menunjukkan keberkesanannya yang tinggi dalam merangsang sistem imun, vaksin tersebut juga perlu dilindungi daripada degradasi oleh proses pencernaan dalam gastrousus. Bagi melindungi dan menghantar antigen secara berkesan, antigen dicadangkan untuk dipamerkan di permukaan pembawa bakteria (bacterial carrier). Strategi sebegini dapat mewujudkan tahap keadjuvanan yang agak tinggi serta sasaran yang bagus dan spesifik (Silin et al. 2007).

LAB terutamanya strain *Lactobacillus* tertentu telah dibangunkan sebagai pembawa bakteria kerana mempunyai ciri-ciri probiotik yang cemerlang seperti status GRAS (generally regarded as safe), keadjuvanan yang tinggi, pelekatan pada permukaan mukosa, imunogenisiti intrinsik yang rendah, berdaya tahan pada asid hempedu dan gastrik. Yap et al. (2016) juga menunjukkan *Lb. casei* berupaya untuk menambah baik keadaan hipertensi dalam model tikus hipertensi spontan melalui perlindungan vaskular. Ciri-ciri tersebut menjadikannya pembawa bakteria yang sesuai dalam reka bentuk dan penghasilan vaksin oral (Pouwels et al. 1998; Seegers 2002; Bermudez-Humaran et al. 2011). Sebaliknya, pembawa bakteria yang lain seperti *Salmonella*, *Escherichia coli* dan virus vaccinia bukan sahaja tidak dapat diklasifikasikan sebagai selamat,

agen tersebut juga sangat imunogenik, oleh itu, tidak sesuai diperkenalkan dalam imunisasi yang berulang (Pouwels et al. 1998).

Lactobacillus merupakan genus yang paling besar dalam LAB dan mengandungi lebih daripada 100 spesies (Claesson, Van Sinderen & O'toole 2007). *Lactobacillus* memiliki ciri-ciri istimewa yang menjadikannya lebih kerap digunakan sebagai perumah bagi pengekspresan dan penghantaran antigen secara mukosa (Cano-Garrido et al. 2015). Bersama dengan *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* memiliki aktiviti probiotik yang lebih prominen dan memberi manfaat kesihatan yang lebih tinggi kepada manusia serta haiwan berbanding dengan genus LAB yang lain (Yap & Sujang 2014). Sesetengah strain *Lactobacillus* merupakan komensal semula jadi dalam saluran GIT, rongga mulut dan saluran urogenital wanita dalam manusia serta haiwan. Kemampuan *Lactobacillus* untuk melekat dan mendiami tisu mukosa dengan efisien membolehkannya bertahan lebih lama dalam saluran GIT berbanding dengan *Lactococcus lactis* (Bermudez-Humaran et al. 2011). Sehubungan itu, *Lactobacillus* telah banyak digunakan dalam kajian vaksin oral sejak tahun 90-an.

Penggunaan *Lactobacillus* sebagai sistem penghantaran antigen bagi pembangunan vaksin oral telah disenaraikan dalam Jadual 1. Antigen bakteria dan virus seperti tetanus toxin fragmen C (TTFC) daripada *Clostridium tetanus* (Reveneau et al. 2002), urease B (UreB) daripada *Helicobacter pylori* (Corthesy et al. 2005) serta protein E7 milik human papillomavirus (HPV) telah diekspreskan di permukaan *Lactobacillus* sp. Apabila diberikan kepada model tikus, *Lactobacillus* rekombinan tersebut berjaya merangsang tindak balas humoral dalam model tikus. Penghasilan glikoprotein permukaan virus influenza seperti HA dan M2 juga telah dikaji dengan menggunakan *Lb. plantarum* (Shi et al. 2014) dan *Lb. casei* (Chowdhury et al. 2014; Li et al. 2015). Protein HA telah diekspreskan secara tunggal sebagai protein intraselular dalam *Lb. plantarum* dan bersama M2 pada permukaan *Lb. casei*. Antibodi dan sel CTLs yang diaktifkan menawarkan perlindungan penuh terhadap H9N2 dalam tikus yang dijangkiti (Shi et al. 2014). Selain itu, vaksin oral yang berdasarkan protein HA dan M2 juga menawarkan perlindungan separa kepada tikus yang dijangkiti oleh H5N1, H1N1, H5N2, H7N3 serta H9N2 secara berasingan (Chowdhury et al. 2014; Li et al. 2015). Kejayaan sedemikian membuktikan strategi untuk membangunkan vaksin oral influenza yang efektif terhadap jangkitan virus influenza A dengan menggunakan *Lactobacillus* sp. dapat direalisasikan dengan bantuan teknologi rekombinan DNA dan biologi molekul.

Baru-baru ini, Tan et al. (2017) telah berjaya menghasilkan *Lb. casei* rekombinan yang dapat mengekspresikan protein NS1 pada permukaan sel dengan menggunakan plasmid pengekspresan pSGANC332. Jumlah protein NS1 yang diekspreskan adalah sebanyak $1.325 \pm 0.065 \mu\text{g}/\text{mg}$ sel basah. Pengekspresan

protein NS1 pada permukaan bakteri juga terbukti dengan teknik imunofluoresens dalam kajian tersebut. Walaupun kajian lanjut seperti analisis keantigenan dan keimunogenan diperlukan untuk menyokong kebolehan *Lactobacillus* rekombinan tersebut sebagai vaksin oral influenza universal, namun dapatan kajian tersebut telah membuktikan kemungkinan untuk membangunkan vaksin oral influenza universal berdasarkan protein NS1 dengan menggunakan *Lactobacillus* sebagai pembawa bakteri.

ISU BIOKESELAMATAN PENGGUNAAN PEMBAWA BAKTERIA DALAM PEMBANGUNAN VAKSIN ORAL

Walaupun pembangunan bakteri asid laktik (LAB) rekombinan sebagai kargo pengekspresan dan penghantaran antigen telah banyak menarik perhatian dalam kalangan ahli vaksinologi, penggunaannya sebagai pembawa bagi agen terapeutik masih menimbulkan kebimbangan dalam kalangan pengguna umum. Sebagai contoh, sistem pengekspresan bakteri seperti LAB membawa gen rintangan antibiotik sebagai penanda selektif. Hal ini mempersoalkan kemungkinan bakteri rekombinan sebegini untuk memindahkan gen rintangan antibiotiknya kepada mikrobiota usus yang lain apabila digunakan sebagai vaksin oral. Walaupun isu ini jarang berlaku, ia masih memerlukan langkah-langkah kawalan yang efektif untuk memastikan keselamatan strain tersebut. Sehingga kini, penggunaan penanda selektif selain gen rintangan antibiotik telah dicadangkan dan masih dalam peringkat kajian (Cano-Garrido et al. 2015). Sebagai contoh, penggunaan penanda selektif FabV/triclosan untuk pengekspresan protein heterologus dalam *E. coli* (Ali et al. 2015). Dalam sistem FabV/triclosan, triclosan merencat pertumbuhan bakteri pada fasa awal pertumbuhan, namun, apabila paras FabV menaik secara mendadak atas aruhan isopropiltio- β -galaktosida (IPTG), aktiviti perencatan triclosan pula dihalang oleh kandungan FabV yang tinggi (Ali & Chew 2015). Sistem FabV/triclosan sekaligus menyelesaikan kemusykilan pemindahan gen rintangan antibiotik kepada mikrobiota usus yang sering dipertikaikan dalam pembangunan vaksin oral.

Selain itu, strategi biokawalan (biocontainment) juga dicadangkan untuk mengelakkan penyebaran strain LAB rekombinan ke persekitaran. Sebagai contoh, Steidler et al. (2003) telah merancang pelan biokawalan sebelum *Lactococcus lactis* yang menghasilkan interleukin 10 (LL-IL10) digunakan dalam percubaan klinikal manusia. Beliau menggantikan gen *thymidylate synthase* A (thyA) dengan gen yang mengekodkan interleukin 10 manusia. Akibatnya, fenotip kebergantungan pada timidin (thymidine auxotroph) diaktifkan dalam strain

LL-IL10. Gastrousus manusia mengandungi timidin yang mencukupi bagi memastikan kelangsungan hidup strain LL-IL10 maka strain tersebut boleh digunakan sebagai vaksin hidup dalam manusia. Namun, apabila berada di luar gastrousus manusia, LL-IL10 gagal menghasilkan timidin. Dengan itu, bakteri tersebut akan mati atas sebab ketiadaan unsur timidin untuk memastikan kelangsungan hidupnya. Keberkesanan pelan biokawalan ini telah dikaji dan divalidasi secara *in vivo* dalam model khinzir malahan terbukti berkesan sebagai langkah biokawalan untuk LL-IL-10. Oleh itu, strain LL-IL10 telah dibenarkan untuk digunakan dalam percubaan klinikal manusia fasa 1 dalam kalangan pesakit penyakit Chron's (Braat et al. 2006).

KESIMPULAN

Kepentingan vaksin influenza universal dalam usaha untuk menangani wabak influenza tahunan dan sebagai persediaan untuk menghadapi pandemik influenza yang bakal berlaku tidak seharusnya dipandang ringan. Tambahan lagi, keberkesanan vaksin suntikan sedia ada yang dihasilkan berdasarkan antigen HA dan NA virus influenza A sering dijejaskan oleh mutasi yang berlaku pada kedua-dua gen tersebut. Oleh sebab yang demikian, ulasan ini memerihalkan kesesuaian untuk mengaplikasikan antigen virus influenza A yang terpelihara seperti NS1 dalam pembangunan vaksin influenza universal. Dengan itu, masalah mutasi yang kerap kali berlaku pada gen *HA* dan *NA* tidak lagi menjadi halangan kepada keberkesanan vaksin influenza malahan disebabkan keterpeliharaan antigen NS1 dalam kalangan subjenis virus influenza A, vaksin yang dihasilkan dapat mencegah jangkitan oleh subjenis virus influenza A yang berlainan serta baru. Bagi mencegah jangkitan virus influenza A pada tapak kemasukannya, ulasan ini turut mencadangkan pembangunan vaksin influenza universal oral dengan menggunakan *Lactobacillus* sebagai pembawa bakteri. Sistem pembawa bakteri sedemikian telah terbukti dapat merangsang tindak balas imun humoral dan selular yang dapat mencengah jangkitan pelbagai patogen dalam model tikus. Secara konklusinya, vaksin influenza universal oral yang dibangunkan dengan menggunakan antigen terpelihara seperti NS1 dan bakteri pembawa *Lactobacillus* berpotensi tinggi untuk mencegah wabak influenza tahunan di samping membendung pandemik influenza yang diakibatkan oleh subjenis virus influenza A yang baru, namun strategi ini memerlukan kajian lanjutan yang lebih intensif bagi memastikan keberkesanan dan isu biokeselamatan vaksin influenza universal oral yang dihasilkan.

JADUAL 1. Penggunaan strain *Lactobacillus* dalam pembangunan vaksin oral

Strain	Aplikasi bioperubatan	Protein rekombinan	Lokasi penghasilan	Huraian	Rujukan
<i>Lb. casei</i>	Tetanus/ <i>Clostridium tetani</i>	TTFC	Permukaan sel	Respons antibodi IgG (selepas pemberian parenteral).	Maassen et al. 1999.
<i>Lb. casei</i>	Tetanus/ <i>Clostridium tetani</i>	TTFC	Intraselular, permukaan sel, ekstraselular	Antigen pada permukaan sel bakteria, maka memerlukan dos yang rendah untuk menjadi imunogenik, namun respons IgG serum yang paling tinggi didapati dalam tikus yang diimmunisasi dengan antigen intraselular.	Reveneau et al. 2002.
<i>Lb. plantarum</i>	Gastritis aktif kronik/ <i>Helicobacter pylori</i> (<i>H. pylori</i>)	UreB	Permukaan sel	Respons antibodi IgA dan IgG, perlindungan separa di tikus.	Corthesy et al. 2005.
<i>Lb. casei</i>	Transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV)	Spike S	Ekstraselular	Respons antibodi IgA dan IgG yang meneutralkan jangkitan TGEV.	Ho, Kwang & Lee 2005.
<i>Lb. casei</i>	Human severe acute respiratory syndrome (SARS)-coronavirus	PsgA dan Spike S	Permukaan sel	Respons antibodi IgG serum dan IgA mukosa, aktiviti peneutralan antibodi adalah lebih tinggi pada tikus yang diimmunisasi secara oral berbanding dengan nasal.	Lee et al. 2006.
<i>Lb. casei</i>	Kanser serviks/Human papillomavirus type 16 (HPV-16)	E7	Permukaan sel	Respons antibodi IgA mukosa dan IgG serum, respons keimunan selular mukosa dan sistemik, kesan antitumor.	Poo et al. 2006.
<i>Lb. plantarum</i>	Kanser serviks/HPV-16	E7	Permukaan sel	<i>Lactobacillus</i> merangsang keimunan sistemik lebih baik berbanding dengan <i>Lactococcus</i> , kesan antitumor.	Cortes-Perez et al. 2007.
<i>Lb. plantarum</i>	Penyakit Lyme/ <i>Borrelia burgdorferi</i>	LpA	Intraselular	Merangsang keimunan mukosa dan sistemik dalam tikus.	Del Rio et al. 2008.
<i>Lb. casei</i>	Kanser serviks/HPV-16	E7	Intraselular	Merangsang limfosit T sitotoksik dalam tisu mukosa, penghantaran oral lebih baik daripada laluan bawah kulit (<i>subcutaneous</i>) dan intramuskular.	Adachi et al. 2010.
<i>Lb. casei</i>	Kanser serviks/HPV-16	E6	Permukaan sel	Respons antibodi IgA mukosa dan IgG serum, respons keimunan selular mukosa dan sistemik, kesan antitumor.	Lee et al. 2010.

Bersambung

JADUAL 1. *Sambungan*

Strain	Aplikasi bioperubatan	Protein rekombinan	Lokasi penghasilan	Huraian	Rujukan
<i>Lb. acidophilus</i>	Human immunodeficiency virus (HIV)/HIV-1	Gag	Permukaan sel	Merangsang sel penghasil IFN- γ dan IgA yang spesifik kepada Gag.	Kajikawa et al. 2012.
<i>Lb. casei</i>	Kanser serviks/HPV-16	L2	Permukaan sel	Respons antibodi mukosa dan sistemik, aktiviti peneutralan bersilang.	Yoon et al. 2012.
<i>Lb. acidophilus</i>	Limfoma MALT, Gastritis kronik, ulser/ <i>H. pylori</i>	Hp0410	Intraselular	Respons antibodi IgA mukosa dan IgG serum.	Hongying et al. 2014.
<i>Lb. casei</i>	Kandidiasis/ <i>Candida albicans</i>	Enolase 1	Permukaan sel	Respons IgG serum yang tinggi, perlindungan dalam tikus yang diimmunisasi.	Shibasaki et al. 2014.
<i>Lb. plantarum</i>	Avian influenza/H9N2	HA	Intraselular	Respons antibodi sIgA, IgG, dan sel CD8+, perlindungan penuh dalam tikus	Shi et al. 2014.
<i>Lb. casei</i>	Avian influenza/H5N1, H1N1, H5N2, H7N3, H9N2	sM2 dan HA2 berkonjugasi dengan CTAI	Permukaan sel	Respons IgG serum dan IgA mukosa, perlindungan terhadap pelbagai subjenis influenza dalam tikus.	Chowdhury et al. 2014; Li et al. 2015.

PENGHARGAAN

Ulasan ini ditanggung oleh geran penyelidikan Fundamental Research Grant Scheme (FRGS/1/2014/SG05/UKM/02/4) daripada Kementerian Pendidikan Tinggi, Malaysia.

RUJUKAN

- Adachi, K., Kawana, K., Yokoyama, T., Fujii, T., Tomio, A., Miura, S., Tomio, K., Kojima, S., Oda, K., Sewaki, T., Yasugi, T., Kozuma, S. & Taketani, Y. 2010. Oral immunization with a *Lactobacillus casei* vaccine expressing human papillomavirus (HPV) type 16 E7 is an effective strategy to induce mucosal cytotoxic lymphocytes against HPV16 E7. *Vaccine* 28(16): 2810-2817.
- Aggarwal, K., Jing, F., Maranga, L. & Liu, J. 2011. Bioprocess optimization for cell culture based influenza vaccine production. *Vaccine* 29(17): 3320-3328.
- Ali, S.A. & Chew, Y.W. 2015. FabV/Triclosan is an antibiotic-free and cost-effective selection system for efficient maintenance of high and medium-copy number plasmids in *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 10(6): e0129547. doi:10.1371/journal.pone.0129547.
- Ali, S.A., Chew, Y.W., Che Omar, T. & Azman, N. 2015. Use of fabV-triclosan plasmid selection system for efficient expression and production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 10(12): e0144189. doi:10.1371/journal.pone.0144189.
- Assarsson, E., Bui, H.H., Sidney, J., Zhang, Q., Glenn, J., Oseroff, C., Mbawuiki, I.N., Alexander, J., Newman, M.J., Grey, H. & Sette, A. 2008. Immunomic analysis of the repertoire of t-cell specificities for influenza A virus in humans. *Journal of Virology* 82(24): 12241-12251.
- Belshan, M.A., Knoop, F.C. & Huggett, K.N. 2014. Influenza A. Dlm. *Reference Module in Biomedical Sciences*, disunting oleh Captan, M.J.: 1-4. Elsevier.
- Bermudez-Humaran, L.G., Kharrat, P., Chatel, J.M. & Langella, P. 2011. Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines. *Microbial Cell Factories* 30(10): 1475-2859.
- Boon, A.C., De Mutsert, G., Graus, Y.M., Fouchier, R.A., Sintnicolaas, K., Osterhaus, A.D. & Rimmelzwaan, G.F. 2002. The magnitude and specificity of influenza A virus-specific cytotoxic t-lymphocyte responses in humans is related to HLA-A and -B phenotype. *Journal of Virology* 76(2): 582-590.
- Braat, H., Rottiers, P., Hommes, D.W., Huyghebaert, N., Remaut, E., Remon, J.P., Van Deventer, S.J., Neiryneck, S., Peppelenbosch, M.P. & Steidler, L. 2006. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 4(6): 754-759.
- Brown, E.G. 2000. Influenza virus genetics. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 54(4): 196-209.
- Cano-Garrido, O., Seras-Franzoso, J. & Garcia-Fruitos, E. 2015. Lactic acid bacteria: reviewing the potential of a promising delivery live vector for biomedical purposes. *Microbial Cell Factories* 14(137): 015-0313.
- Carr, S. 2012. Seasonal and Pandemic Influenza: An overview with pediatric focus. *Advance in Pediatrics* 59(1): 75-93.
- CDC. 2005. *Prevention and Control of Influenza Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)*. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr5408.pdf> [8 Desember 2016].
- CDC. 2016. *Key Facts About Seasonal Flu Vaccine*. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/flu/protect/keyfacts.htm> [7 November 2016].
- Chowdhury, M.Y., Li, R., Kim, J.H., Park, M.E., Kim, T.H., Pathinayake, P., Weeratunga, P., Song, M.K., Son, H.Y., Hong, S.P., Sung, M.H., Lee, J.S. & Kim, C.J. 2014. Mucosal vaccination with recombinant *Lactobacillus casei*-displayed CTA1-conjugated consensus matrix protein-2 (Sm2) induces broad protection against divergent influenza subtypes in Balb/C mice. *PLoS One* 9(4): e94051.
- CIDRAP 2017. *Malaysia reports first H5N1 outbreak in nearly 10 years*. University of Minnesota: Center for Infectious Disease Research and Policy. <http://www.cidrap.umn.edu/news-perspective/2017/03/malaysia-reports-first-h5n1-outbreak-nearly-10-years>. [08 March 2017].
- Claesson, M.J., Van Sinderen, D. & O'toole, P.W. 2007. The genus *Lactobacillus*: a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiology Letters* 269(1): 22-28.
- Cortes-Perez, N.G., Lefevre, F., Corthier, G., Adel-Patient, K., Langella, P. & Bermudez-Humaran, L.G. 2007. Influence of the route of immunization and the nature of the bacterial vector on immunogenicity of mucosal vaccines based on lactic acid bacteria. *Vaccine* 25(36): 6581-6588.
- Corthesy, B., Boris, S., Isler, P., Grangette, C. & Mercenier, A. 2005. Oral immunization of mice with lactic acid bacteria producing *Helicobacter pylori* urease B subunit partially protects against challenge with *Helicobacter felis*. *The Journal of Infectious Diseases* 192(8): 1441-1449.
- Cross, T.A., Dong, H., Sharma, M., Busath, D.D. & Zhou, H.X. 2012. M2 protein from influenza A: from multiple structures to biophysical and functional insights. *Current Opinion in Virology* 2(2): 128-133.
- De Filette, M., Min Jou, W., Birkett, A., Lyons, K., Schultz, B., Tonkyro, A., Resch, S. & Fiers, W. 2005. Universal influenza A vaccine: optimization of M2-based constructs. *Virology* 337(1): 149-161.
- De Jong, M.D. & Hien, T.T. 2006. Avian influenza A (H5N1). *Journal of Clinical Virology* 35(1): 2-13.
- Del Rio, B., Dattwyler, R.J., Aroso, M., Neves, V., Meirelles, L., Seegers, J.F. & Gomes-Solecki, M. 2008. Oral immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum* induces a protective immune response in mice with Lyme disease. *Clinical and Vaccine Immunology* 15(9): 1429-1435.
- Du, L., Zhou, Y. & Jiang, S. 2010. Research and development of universal influenza vaccines. *Microbes and Infection* 12(4): 280-286.
- Dundon, W.G. & Capua, I. 2009. A closer look at the NS1 of influenza virus. *Viruses* 1(3): 1057-1072.
- Eagles, D., Siregar, E.S., Dung, D.H., Weaver, J., Wong, F. & Daniels, P. 2009. H5N1 highly pathogenic avian influenza in southeast Asia. *International Office of Epizootics* 28(1): 341-348.
- Engel, D.A. 2013. The influenza virus NS1 protein as a therapeutic target. *Antiviral Research* 99(3): 409-416.
- Fiers, W., De Filette, M., Bakkouri, K.E., Schepens, B., Roose, K., Schotsaert, M., Birkett, A. & Saelens, X. 2009. M2e-based universal influenza A vaccine. *Vaccine* 27(45): 6280-6283.
- Grohskopf, L.A., Sokolow, L.Z., Broder, K.R., Olsen, S.J., Karron, R.A., Jernigan, D.B. & Bresee, J.S. 2016. Prevention

- and control of seasonal influenza with vaccines. *MMWR Recommendations and Reports* 65(5): 1-54.
- Hale, B.G., Randall, R.E., Ortin, J. & Jackson, D. 2008. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *Journal of General Virology* 89(Pt 10): 2359-2376.
- Haq, K. & McElhaney, J.E. 2014. Immunosenescence: Influenza vaccination and the elderly. *Current Opinion in Immunology* 29: 38-42.
- Ho, P.S., Kwang, J. & Lee, Y.K. 2005. Intra-gastric administration of *Lactobacillus casei* expressing transmissible gastroenteritis coronavirus spike glycoprotein induced specific antibody production. *Vaccine* 23(11): 1335-1342.
- Hongying, F., Xianbo, W., Fang, Y., Yang, B. & Beiguo, L. 2014. Oral immunization with recombinant *Lactobacillus acidophilus* expressing the adhesin Hp0410 of *Helicobacter pylori* induces mucosal and systemic immune responses. *Clinical and Vaccine Immunology* 21(2): 126-132.
- Hutchinson, E.C., Charles, P.D., Hester, S.S., Thomas, B., Trudgian, D., Martinez-Alonso, M. & Fodor, E. 2014. Conserved and host-specific features of influenza virion architecture. *Nature Communications* 5: 4816.
- Iqbal, M., Reddy, K.B., Brookes, S.M., Essen, S.C., Brown, I.H., McCauley, J.W. 2014. Virus pathotype and deep sequencing of the HA gene of a low pathogenicity H7N1 avian influenza virus causing mortality in turkeys. *PLoS ONE* 9(1): e87076.
- James, S.H. & Whitley, R.J. 2017. 172 - Influenza viruses A2 - Cohen, Jonathan. Dlm. *Infectious Diseases (Fourth Edition)*, disunting oleh Powderly, W.G. & Opal, S.M.: 1465-1471. e1461. Elsevier.
- Jameson, J., Cruz, J. & Ennis, F.A. 1998. Human cytotoxic t-lymphocyte repertoire to influenza A viruses. *Journal of Virology* 72(11): 8682-8689.
- Kajikawa, A., Zhang, L., Long, J., Nordone, S., Stoeker, L., Lavoy, A., Bumgardner, S., Klaenhammer, T. & Dean, G. 2012. Construction and immunological evaluation of dual cell surface display of HIV-1 gag and *Salmonella enterica* serovar typhimurium FliC in *Lactobacillus acidophilus* for vaccine delivery. *Clinical and Vaccine Immunology* 19(9): 1374-1381.
- Kamps, B.S. & Reyes-Teran, G. 2006. Influenza. Dlm. *Influenza Report*, disunting oleh Kamps, B.S., Hoffmann, C. & Preiser, W.: 17-38. Paris: Flying Publisher.
- Kuiken, T. & Taubenberger, J.K. 2008. Pathology of human influenza revisited. *Vaccine* 12(26): D59-66.
- Kuwano, K., Scott, M., Young, J. F. & Ennis, F. A. 1989. Active immunization against virus infections due to antigenic drift by induction of cross-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* 169(4): 1361-1371.
- Lam, W.Y., Tang, J.W., Yeung, A.C.M., Chiu, L.C.M., Sung, J.J.Y. & Chan, P.K.S. Avian influenza virus A/HK/483/97(H5N1) NS1 protein induces apoptosis in human airway epithelial cells. *Journal of Virology* 82(6): 2741-2751.
- Lee, C.W. & Saif, Y.M. 2009. Avian influenza virus. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 32(4): 301-310.
- Lee, J.S., Poo, H., Han, D.P., Hong, S.P., Kim, K., Cho, M.W., Kim, E., Sung, M.H. & Kim, C.J. 2006. Mucosal immunization with surface-displayed severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein on *Lactobacillus casei* induces neutralizing antibodies in mice. *Journal of Virology* 80(8): 4079-4087.
- Lee, T.Y., Kim, Y.H., Lee, K.S., Kim, J.K., Lee, I.H., Yang, J.M., Sung, M.H., Park, J.S. & Poo, H. 2010. Human papillomavirus type 16 E6-specific antitumor immunity is induced by oral administration of HPV16 E6-expressing *Lactobacillus casei* in C57Bl/6 Mice. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 59(11): 1727-1737.
- Li, R., Chowdhury, M.Y.E., Kim, J.-H., Kim, T.-H., Pathinayake, P., Koo, W.-S., Park, M.-E., Yoon, J.-E., Roh, J.-B., Hong, S.-P., Sung, M.-H., Lee, J.-S. & Kim, C.-J. 2015. Mucosally administered *Lactobacillus* surface-displayed influenza antigens (sM2 and HA2) with cholera toxin subunit A1 (CTA1) induce broadly protective immune responses against divergent influenza subtypes. *Veterinary Microbiology* 179(3-4): 250-263.
- Liang, S., Mozdanzowska, K., Palladino, G., Gerhard, W. 1994. Heterosubtypic immunity to influenza type A virus in mice: effector mechanisms and their longevity. *Journal of Immunology* 152: 1653-1661.
- Lu, Y., Welsh, J.P. & Swartz, R. 2014. Production and stabilization of the trimeric influenza hemagglutinin stem domain for the potential broadly protective influenza vaccines. *PNAS* 111(1): 125-130.
- Maassen, C.B., Laman, J.D., Den Bak-Glashouwer, M.J., Tielens, F.J., Van Holten-Neelen, J.C., Hoogteijling, L., Antonissen, C., Leer, R.J., Pouwels, P.H., Boersma, W.J. & Shaw, D.M. 1999. Instruments for oral disease-intervention strategies: recombinant *Lactobacillus casei* expressing tetanus toxin fragment C for vaccination or myelin proteins for oral tolerance induction in multiple sclerosis. *Vaccine* 17(17): 2117-2128.
- Murakami, S., Horimoto, T., Mai Le, Q., Nidom, C. A., Chen, H., Muramoto, Y., Yamada, S., Iwasa, A., Iwatsuki-Horimoto, K., Shimojima, M., Iwata, A. & Kawaoka, Y. 2008. Growth determinants for H5N1 influenza vaccine seed viruses in MDCK cells. *Journal of Virology* 82(21): 10502-10509.
- Mustapha Abubakar, Aini Ideris, Abdul Rahman Omar & Mohd Hair Bejo. 2011. Cloning and expression of highly pathogenic avian influenza virus full-length nonstructural gene in *Pichia pastoris*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011: 414198.
- OIE. 2012. *OIE Terrestrial Manual 2012: Avian Influenza*. Paris: World Organization for Animal Health.
- Olivares, M., Diaz-Ropero, M. P., Sierra, S., Lara-Villoslada, F., Fonolla, J., Navas, M., Rodriguez, J. M. & Xaus, J. 2007. Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition* 23(3): 254-260.
- Ong, L.L. & Chan, G.F. 2012. Mini review: a glimpse of nonstructural protein 1 of Influenza A H1N1. *Insight Pathology* 1(1): 1-6.
- Peiris, J.S., De Jong, M.D. & Guan, Y. 2007. Avian influenza virus (H5N1): A threat to human health. *Clinical Microbiology Reviews* 20(2): 243-267.
- Poo, H., Pyo, H.M., Lee, T.Y., Yoon, S.W., Lee, J.S., Kim, C.J., Sung, M.H. & Lee, S.H. 2006. Oral administration of human papillomavirus type 16 E7 displayed on *Lactobacillus casei* induces E7-specific antitumor effects in C57/Bl6 mice. *International Journal of Cancer* 119(7): 1702-1709.
- Pouwels, P.H., Leer, R.J., Shaw, M., Heijne Den Bak-Glashouwer, M.J., Tielens, F.D., Smit, E., Martinez, B., Jore, J. & Conway, P.L. 1998. Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles

- for oral immunization purposes. *International Journal of Food Microbiology* 41(2): 155-167.
- Punpanich, W. & Chotpitayasunondh, T. 2012. A review on the clinical spectrum and natural history of human influenza. *International Journal of Infectious Diseases* 16(10): e714-e723.
- Quan, F.-S., Compans, R.W. & Kang, S.-M. 2012. Oral vaccination with inactivated influenza vaccine induces cross-protective immunity. *Vaccine* 30(2): 180-188.
- Reveneau, N., Geoffroy, M.-C., Loch, C., Chagnaud, P. & Mercenier, A. 2002. Comparison of the immune responses induced by local immunizations with recombinant *lactobacillus plantarum* producing tetanus toxin fragment C in different cellular locations. *Vaccine* 20(13-14): 1769-1777.
- Robb, N.C., Jackson, D., Vreede, F.T. & Fodor, E. 2010. Splicing of influenza A virus NS1 mRNA is independent of the viral NS1 protein. *Journal of General Virology* 91(Pt 9): 2331-2340.
- Richt, J.A. & Garcia-Sastre, A. 2009. Attenuated influenza virus vaccines with modified NS1 proteins. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 333: 177-195.
- Russell, M.W. & Mestecky, J. 2015. Chapter 55 - mucosal vaccines: an overview. Dlm. *Mucosal Immunology (Fourth Edition)*: 1039-1046. Boston: Academic Press.
- Schotsaert, M., De Filette, M., Fiers, W. & Saelens, X. 2009. Universal M2 ectodomain-based influenza a vaccines: preclinical and clinical developments. *Expert Review of Vaccines* 8(4): 499-508.
- Schulman, J.L. & Kilbourne, E.D. 1965. Induction of partial specific heterotypic immunity in mice by a single infection with influenza A virus. *Journal of Bacteriology* 89: 170-174.
- Seegers, J.F. 2002. lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. *Trends in Biotechnology* 20(12): 508-515.
- Shaw, A. 2012. New technologies for new influenza vaccines. *Vaccine* 30(33): 4927-4933.
- Shaw, M.W., Lamon, E.W. & Compans, R.W. 1981. Surface expression of a nonstructural antigen on influenza A virus-infected cells. *Infection and Immunity* 34(3): 1065-1067.
- Shi, S.-H., Yang, W.-T., Yang, G.-L., Cong, Y.-L., Huang, H.-B., Wang, Q., Cai, R.-P., Ye, L.-P., Hu, J.-T., Zhou, J.-Y., Wang, C.-F. & Li, Y. 2014. Immunoprotection against influenza virus H9N2 by the oral administration of recombinant *lactobacillus plantarum* NC8 expressing hemagglutinin in balb/C mice. *Virology* 464-465: 166-176.
- Shibasaki, S., Karasaki, M., Tafuku, S., Aoki, W., Sewaki, T. & Ueda, M. 2014. Oral immunization against candidiasis using *lactobacillus casei* displaying enolase 1 from *candida albicans*. *Scientia Pharmaceutica* 82(3): 697-708.
- Silin, D.S., Lyubomska, O.V., Jirathitikal, V. & Bourinbaiar, A.S. 2007. Oral vaccination: where we are? *Expert Opinion on Drug Delivery* 4(4): 323-340.
- Soema, P.C., Kompier, R., Amorij, J.P. & Kersten, G.F. 2015. Current and next generation influenza vaccines: formulation and production strategies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 94: 251-263.
- Stanekova, Z. & Vareckova, E. 2010. Conserved epitopes of influenza a virus inducing protective immunity and their prospects for universal vaccine development. *Virology Journal* 7(351): 7-351.
- Steel, J., Lowen, A.C., Pena, L., Angel, M., Solorzano, A., Albrecht, R., Perez, D.R., Garcia-Sastre, A. & Palese, P. 2009. Live attenuated influenza viruses containing ns1 truncations as vaccine candidates against H5N1 highly pathogenic avian influenza. *Journal of Virology* 83(4): 1742-1753.
- Steidler, L., Neiryneck, S., Huyghebaert, N., Snoeck, V., Vermeire, A., Goddeeris, B., Cox, E., Remon, J. P. & Remaut, E. 2003. Biological containment of genetically modified *lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10. *Nature Biotechnology* 21(7): 785-789.
- Subbarao, K. & Matsuoka, Y. 2013. The prospects and challenges of universal vaccines for influenza. *Trends in Microbiology* 21(7): 350-358.
- Tan, T.S., Syed Hassan, S. & Yap, W.B. Expression of surface-bound nonstructural 1 (NS1) protein of influenza virus A H5N1 on *Lactobacillus casei* strain C1. *Letters in Applied Microbiology* 64(6): 446-451.
- Tee, K.K., Takebe, Y. & Kamarulzaman, A. 2009. Emerging and re-emerging viruses in Malaysia, 1997-2007. *International Journal of Infectious Diseases* 13(3): 307-318.
- Tynell, J., Melen, K. & Julkunen, I. 2014. Mutations within the conserved NS1 nuclear export signal lead to inhibition of influenza A virus replication. *Virology Journal* 11(128): 11-128.
- Villena, J., Oliveira, M.L., Ferreira, P.C., Salva, S. & Alvarez, S. 2011. Lactic acid bacteria in the prevention of pneumococcal respiratory infection: future opportunities and challenges. *International Immunopharmacology* 11(11): 1633-1645.
- Wanasawaeng, W., Bunpapong, N., Leelamanit, W. & Thanawongnuwech, R. 2009. Growth characteristics of the H5N1 avian influenza virus in chicken embryonic eggs and MDCK cells. *Thailand Journal of Veterinary Medicine* 39 (3): 281-286.
- WGO. 2009. World gastroenterology organisation practice guideline: probiotics and prebiotics. *Arab Journal of Gastroenterology* 10(1): 33-42.
- WHO. 2012. H5N1 avian influenza: timeline of major events. Geneva: World Health Organization. http://www.who.int/influenza/H5N1_avian_influenza_update_20121217b.pdf [8 Disember 2016].
- WHO. 2016. Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A (H5N1) reported to WHO, 2003-2016. Geneva: World Health Organization. http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/EN_GIP_20160404cumulativenumberH5N1cases.pdf [8 Disember 2016].
- Yamada, A., Ziese, M.R., Young, J.F., Yamada, Y.K. & Ennis, F.A. 1985. Influenza virus hemagglutinin-specific cytotoxic T cell response induced by polypeptide produced in *escherichia coli*. *Journal of Experimental Medicine* 162(2): 663-674.
- Yap, W.B., Ahmad, F.M., Lim, Y.C. & Zainalabidin, S. 2016. *Lactobacillus casei* strain C1 attenuates vascular changes in spontaneously hypertensive rats. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology* 20(6): 621-628.
- Yap, W.B. & Sujang, R. 2014. The health benefits of probiotics. *Jurnal Sains Kesihatan Malaysia* 12(2): 41-44.
- Yap, W.B., Sujang, R. & Tan, T.S. 2015. Identification and characterization of lactic acid bacteria (LAB) isolated from probiotic drinks in Malaysia. *Jurnal Sains Kesihatan Malaysia* 13(1): 23-31.
- Yoon, S.-W., Lee, T.-Y., Kim, S.-J., Lee, I.-H., Sung, M.-H., Park, J.-S. & Poo, H. 2012. Oral administration of HPV-16

- L2 displayed on *Lactobacillus casei* induces systematic and mucosal cross-neutralizing effects in balb/C mice. *Vaccine* 30(22): 3286-3294.
- Youil, R., Su, Q., Toner, T.J., Szymkowiak, C., Kwan, W.S., Rubin, B., Petrukhin, L., Kiseleva, I., Shaw, A.R. & Distefano, D. 2004. comparative study of influenza virus replication in vero and MDCK cell lines. *Journal of Virological Methods* 120(1): 23-31.
- Zhirnov, O.P., Isaeva, E.I., Konakova, T.E., Thoidis, G., Piskareva, L.M., Akopova, Ii, Kartashov, A., Altstein, A.D., Ilyinskii, P.O. & Shneider, A.M. 2007. Protection against mouse and avian influenza A strains via vaccination with a combination of conserved proteins NP, M1 and NS1. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 1(2): 71-79.
- Zou, P., Liu, W. & Chen, Y.H. 2005. The epitope recognized by a monoclonal antibody in influenza A virus M2 protein is immunogenic and confers immune protection. *International Immunopharmacology* 5(4): 631-635.

Yap Wei Boon
Toong Seng Tan
Program Sains Bioperubatan dan
Pusat Sains Kesihatan dan Gunaan
Fakulti Sains Kesihatan, Universiti Kebangsaan Malaysia
Jalan Raja Muda Abdul Aziz, 50300 Kuala Lumpur
Malaysia

Sharifah Syed Hassan
Jeffrey Cheah School of Medicine and Health Sciences
Monash University Malaysia
Jalan Lagoon Selatan
Bandar Sunway, 47500 Subang Jaya
Selangor, Darul Ehsan
Malaysia

Pengarang untuk dihubungi: Yap Wei Boon
E-mel: yapweiboon@ukm.edu.my

Tel: +603-9289 7920
Faks: +603-2692 9032

Diterima: Januari 2018
Diterima untuk diterbitkan: Mac 2018