

## **Estamos protegidos após a vacinação contra a gripe? Resposta imunitária para o vírus da gripe numa coorte de adultos vacinados na época de 2017/2018**

*Are we protected after seasonal influenza vaccine uptake? Immune response for influenza virus in a cohort of vaccinated adults during 2017/2018 season*

Raquel Guiomar<sup>1</sup>, Ana Paula Rodrigues<sup>2</sup>, Inês Costa<sup>1</sup>, Patrícia Conde<sup>1</sup>, Paula Cristóvão<sup>1</sup>, Pedro Pechirra<sup>1</sup>, Paulo Estragadinho<sup>2</sup>, Baltazar Nunes<sup>2</sup>, Silva Graça<sup>3</sup>

raquel.guiomar@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe e outros Vírus Respiratórios, Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P.

(2) Departamento de Epidemiologia, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P.

(3) Departamento de Saúde Ocupacional, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P.

### **\_Resumo**

A vacina contra a gripe é hoje a principal forma de prevenção da doença, reduzindo o risco e as complicações associadas à infeção. A vacinação anual é recomendada pela Direção Geral da Saúde (DGS) de acordo com a norma da vacinação contra a gripe. O Instituto Nacional de Saúde, I.P. (INSA) no âmbito da sua missão como laboratório de Estado, das suas competências específicas para a vigilância epidemiológica das doenças infecciosas, nas componentes laboratorial e epidemiológica e das competências no âmbito do Programa Nacional de Vigilância da gripe, implementou um estudo para avaliar a resposta imunitária à vacina contra a gripe. Foi efetuado o seguimento de uma coorte de 74 indivíduos que voluntariamente aceitaram tomar a vacina e realizar a avaliação da presença de anticorpos contra o vírus da gripe em três momentos: antes da toma da vacina, 30 dias e 6 meses após a vacinação. Foi avaliada a presença de anticorpos para os vírus da gripe contemplados na vacina sazonal do hemisfério norte, recomendada para a época de 2017/2018. Foi observado um aumento da seroprevalência e do título de anticorpos para os 3 vírus contemplados na vacina, 30 dias após a administração. Estes valores foram mais elevados para os vírus do tipo A. Para o subtipo A(H3N2), a seroprevalência e o título de anticorpos foram significativamente mais elevados nos indivíduos com idade superior a 50 anos; para o subtipo A(H1N1)pdm09 a seroprevalência foi significativamente mais elevada nos participantes que não se tinham vacinado nas duas épocas anteriores. A seroconversão foi significativamente mais frequente nos indivíduos que não se tinham vacinado nas duas épocas anteriores e com título de anticorpos mais baixo antes da toma da vacina. Nos 13 casos de síndrome gripal registados, apenas foi confirmado um caso de infeção pelo vírus da gripe do subtipo A(H3N2). Seis meses após a vacinação foi observada uma diminuição da seroprevalência e do título dos anticorpos para os 3 vírus vacinais, estando próximo dos valores observados no momento antes da toma da vacina. A vacinação contra a gripe promoveu a aquisição de imunidade indicando, no entanto que a idade e a vacinação anterior podem influenciar a resposta imunitária. A dinâmica de anticorpos contra a gripe observada neste estudo, vem suportar a necessidade da vacinação anual, no início de cada outono/inverno. O estudo pretende contribuir para a gestão e calendarização da campanha anual de vacinação contra a gripe recomendada pela DGS.

### **\_Abstract**

The flu vaccine is now one of the ways to prevent the disease, reducing the risk and complications associated with the infection. The annual influenza vaccine uptake is recommended by the General Directorate of Health (DGS) according to the recommendations for influenza vaccine uptake. The National Institute of Health, I.P. (INSA) in the scope of its mission as a State Laboratory, its specific competences for the epidemiological surveillance of infectious diseases, in the laboratory and epidemiology components and activities in the National Influenza Surveillance Program, implemented a study to evaluate the production of antibodies against influenza and the duration of immunity after influenza vaccine. During the study was followed a cohort of 74 participants who voluntarily agreed to uptake the vaccine and to be evaluated for influenza antibodies in three moments: before vaccine uptake, 30 days and 6 months after vaccination. Were assessed the antibodies against influenza viruses included in the 2017/2018 northern hemisphere seasonal vaccine. It was observed that the vaccine increased the seroprevalence and antibody titre for the 3 viruses included in the vaccine, 30 days after administration. These values were higher for influenza A viruses. The seroprevalence and antibody titre for subtype A (H3N2) were significantly higher in participants 50 years and older; for subtype A (H1N1)pdm09 seroprevalence was significantly higher in participants who hadn't been vaccinated in the previous two seasons. Seroconversion was significantly higher for the ones that hadn't been vaccinated in the two previous seasons and with lower antibody titre before vaccination. In the 13 reported influenza like symptoms cases, only one influenza A(H3N2) infection has been confirmed. At the end of the study (6 months after vaccination) a decrease in seroprevalence and on antibody titre was observed for the 3 vaccine viruses, being close to the values observed at the beginning of the study. Influenza vaccination elicited the acquisition of immunity, however, age and previous vaccination may influence the immune response. The observed antibody dynamics supports the need for annual vaccination at the beginning of each autumn/winter season. The data aim to contribute to the management and timing of the annual influenza vaccination campaign recommended at national level by the DGS.

## \_Introdução

A vacina contra a gripe é hoje uma das formas mais importantes de prevenção da doença, reduzindo o risco e as complicações associadas à infeção pelo vírus da gripe (1). Devido à natureza do vírus da gripe e à sua capacidade de evolução através da aquisição de mutações é necessário que a vacina seja reformulada anualmente para garantir uma maior proteção para os vírus que estão em circulação (2). A vacina pode ser administrada à população em geral com mais de 6 meses de idade e é especialmente recomendada para grupos de risco de acordo com as orientações da Direção Geral da Saúde, publicadas anualmente (3). A vacina trivalente contra a gripe é constituída por componentes antigénicos de três vírus: vírus da gripe dos subtipos A(H3N2) e A(H1N1)pdm09 e de uma das linhagens do vírus influenza B (4). Após a administração da vacina antigripal é induzida uma resposta imunitária para diferentes tipos/subtipos do vírus da gripe. De acordo com a literatura, a resposta imunitária poderá estar associada ao sexo, idade, história de infeções ou contactos com o vírus da gripe e também à toma da vacina em invernos anteriores (5)(6).

Em 2017, a Organização Mundial de Saúde (OMS) referiu que a realização de estudos serológicos é de elevada importância, contribuindo com informação para o melhor conhecimento dos determinantes do hospedeiro para a infeção, podendo assim suportar as decisões em saúde pública para a prevenção e controlo da gripe (7). O Instituto Nacional de Saúde, I.P. (INSA) no âmbito da sua missão como laboratório de Estado (8), das suas competências específicas para a vigilância epidemiológica das doenças infecciosas, nas componentes laboratorial e epidemiológica (9) e das competências no âmbito do Programa Nacional de Vigilância da Gripe (10), implementou um estudo para avaliar a resposta imunitária à vacina contra a gripe. O estudo envolveu o seguimento de uma coorte de indivíduos vacinados para avaliar a imunidade adquirida após a vacinação e acompanhar a dinâmica dos anticorpos ao longo do tempo, contribuindo desta forma para a avaliação e monitorização da resposta imunitária à vacina e à duração dos anticorpos produzidos. Estudos desta nature-

za pretendem contribuir para a determinação de estratégias e planeamento de programas de vacinação, bem como para a análise da efetividade da vacina antigripal (11).

## \_Objectivos

O estudo avaliou a produção de anticorpos para o vírus da gripe e a duração da imunidade conferida pela vacina antigripal recomendada para a época de 2017/2018. Pretendeu-se estudar a associação da idade e do estado vacinal, nas duas épocas anteriores, com a resposta imunitária após a toma da vacina.

## \_Material e métodos

Foi implementado um estudo de coorte, na época de 2017/2018. Os profissionais de saúde, funcionários do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA, Lisboa) foram convidados a participar no estudo durante a campanha anual de vacinação contra a gripe promovida pelo Departamento de Saúde Ocupacional (DSO) do INSA.

Participaram no estudo 74 indivíduos, com idade compreendida entre os 30 e 69 anos. Os participantes foram seguidos durante o período de outubro de 2017 a junho de 2018. A vacina antigripal (inativada, purificada, contendo 45 microgramas de antígeno da hemaglutinina por 0,5ml de suspensão injetável) foi disponibilizada e administrada no DSO do INSA.

Todos os registos foram centralizados no DSO para garantir o anonimato e confidencialidade da informação relativa aos participantes. Para cada indivíduo selecionado, foram registados os dados clínicos e demográficos (idade, sexo, comorbidades e vacinação antigripal nas duas épocas anteriores: 2015/2016 e/ou em 2016/2017 (Tabela I). Aos participantes foram colhidas 3 amostras de sangue: antes da toma da vacina ( $S_0$ ), 30 dias após a vacinação ( $S_0+30d$ ) e 6 meses após a vacinação ( $S_0+6m$ ) (Figura 1).

As determinações laboratoriais dos títulos de anticorpos foram realizadas por metodologia padronizada, conforme o manual para diagnóstico laboratorial e vigilância virológica da gripe (2). Os soros foram pré-tratados para a remoção de

**Tabela I:** Características dos participantes no estudo de coorte de adultos aos quais foi administrada a vacina antigripal na época de 2017/2018.

Participantes	Total	n	%
		74	
Sexo	Feminino	59	79,7
	Masculino	15	20,3
Grupo Etário	30-49	34	45,9
	50-69	40	54,1
Vacinação anterior <sup>a</sup> nas épocas 2015/16 e/ou 2016/2017	não-vacinado	19	29,2
	1 vacina <sup>c</sup>	15	23,1
	2 vacinas <sup>d</sup>	31	47,7
Doenças crónicas	não	72	97,3
	desconhece	2	2,7
Síndrome Gripal <sup>e</sup>	Sim	13 <sup>b</sup>	17,6
	Não	61	82,4

<sup>a</sup> desconhecido em 9 casos

<sup>d</sup> vacinas de 2015/2016 e 2016/17

<sup>b</sup> 1 positivo para A(H3)

<sup>e</sup> definição caso (13)

<sup>c</sup> vacina de 2015/2016 ou 2016/17

inibidores não específicos da hemaglutinação [com RDE (II) "SEIKEN"; Denka Seiken Co. Ltd.] e testados em diluições em série, 1:[10x2<sup>k</sup>], começando em k=0. O título de anticorpos foi determinado pelo ensaio de inibição da hemaglutinação (HAI) e determinado como a maior diluição que inibe completamente o vírus. Os ensaios laboratoriais foram realizados em condições laboratoriais de nível 2 de biossegurança. Aos soros com título ≤ 10 foi atribuído o título de 5 para permitir o cálculo da média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT). Títulos de anticorpos iguais ou superiores a 40 (HAI ≥ 40) foram considerados protetores (12).

Foi avaliada a presença de anticorpos para os vírus da gripe recomendados pela Organização Mundial de Saúde para a composição da vacina sazonal do hemisfério norte, em 2017/2018: A/Michigan/45/2015 - A (H1N1)pdm09, A/Hong Kong/4801/2014 - AH3N2 e B/Brisbane/60/2008 - linhagem B / Victoria (4).

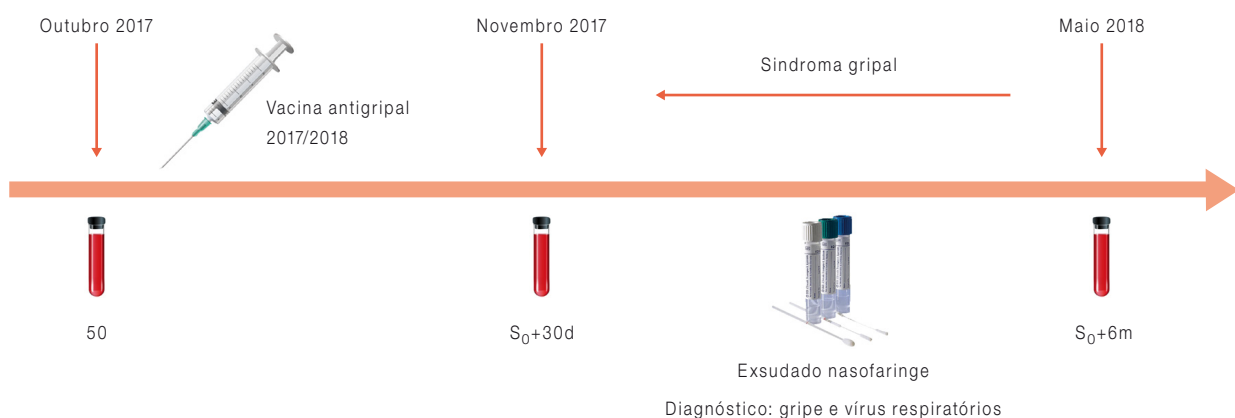
Durante o período de estudo, foi realizados aos participantes que apresentaram sinais e sintomas de síndrome gripal (13) o diagnóstico laboratorial da gripe e de outros vírus respiratórios (por métodos de biologia molecular – PCR em multiplex) para a deteção dos tipos/subtipos sazonais do vírus da gripe, das linhagens do vírus da gripe do tipo B e de outros vírus respiratórios (vírus sincicial respiratório, rinovírus, adenovírus, vírus parainfluenza, metapneumovírus e coronavírus).

A análise estatística efetuada incluiu a análise descritiva da população em estudo, o cálculo da seroprevalência (% HAI ≥ 40) e a média geométrica do título de anticorpos (GMT) com um intervalo de confiança de 95% (95%IC) nos três momentos de colheita de sangue. Foi determinada a seroconversão do título de anticorpos 30 dias após a vacinação, sendo considerada como o aumento de quatro vezes o título de anticorpos entre S<sub>0</sub> e S<sub>0</sub>+30d. A análise estatística foi realizada com o programa v24; IBM SPSS, Chicago IL.

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

Todos os participantes assinaram um consentimento informado para a participação no estudo sendo garantido o anonimato não relacionável das amostras biológicas.

**Figura I:** Estudo de seguimento de uma coorte de adultos vacinados na época de 2017/2018.



## \_Resultados

Durante a época de vigilância da gripe de 2017/2018, 74 participantes foram voluntariamente vacinados e realizaram a colheita de 3 amostras de sangue. A idade média dos participantes foi de 50 anos (variou entre os 30 e os 69 anos). A maioria dos participantes eram mulheres, 80% (59/74). A história vacinal foi indicada para 65 dos participantes e 70% destes tinham sido vacinados pelo menos uma vez nos dois invernos anteriores ao estudo, sendo na sua maioria indivíduos com mais de 50 anos. Nenhum dos participantes referiu doença crónica. Durante o período de estudo, 18% (13/74) dos participantes declararam sinais e sintomas de síndrome gripal (Tabela I).

A avaliação dos anticorpos para o vírus da gripe mostrou que no início do estudo os participantes apresentavam anticorpos para os vírus vacinais. A seroprevalência antes da toma da vacina era mais elevada para o vírus do subtipo A(H3N2), A/Hong Kong/4801/2014 (42%; 95%IC: 31-53%), predominante em circulação na época anterior (2016/2017). A seroprevalência para o vírus B/Victoria, B/Brisbane/60/2008 foi de 32% (95%IC: 22-43%) e de 23% (95%IC: 13-33%) para o vírus A(H1N1), A/Michigan/45/2015. Os valores de GMT refletiram a seroprevalência observada (Figura 2).

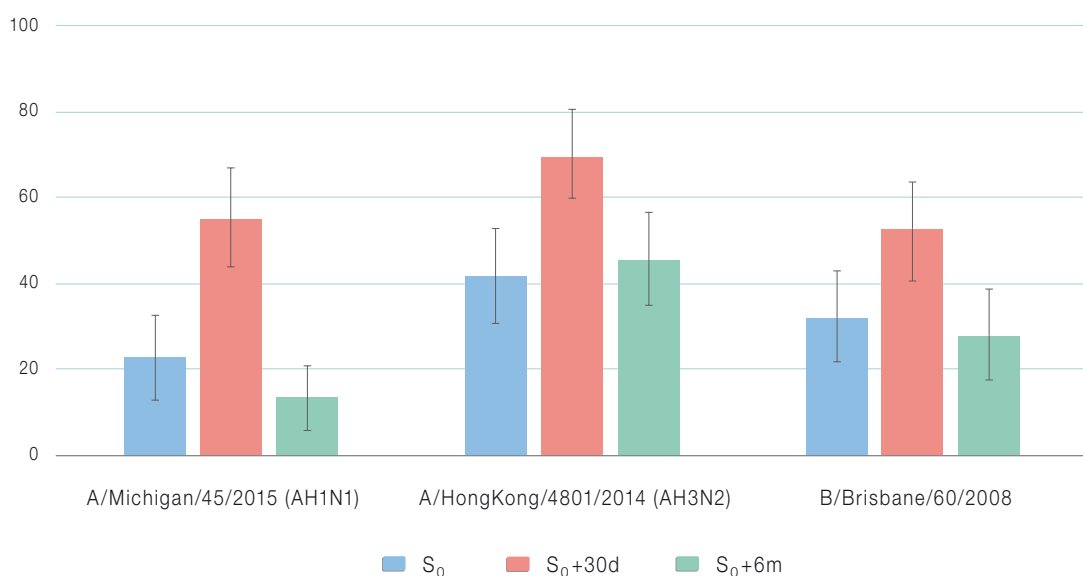
Trinta dias após a administração da vacina foi observado um aumento da seroprevalência e do GMT para os 3 vírus incluídos na vacina. Foi observado um aumento seroprevalência e valores de GMT para o subtipo A(H3N2) [70% (95%IC: 60-81%); GMT 49 (39-61)] comparativamente com a seroprevalência para os vírus A(H1N1) [55% (95%IC: 44-67%); GMT 36 (29-46)] e B/Victoria [53% (95%IC: 41-64%) e GMT 29 (25-34)].

Seis meses após a vacinação, foi observada uma diminuição da seroprevalência e dos valores de GMT para os 3 vírus vacinais, estando próximo dos valores observados no momento inicial do estudo (Figura 2). A seroprevalência mais baixa foi observada para o subtipo A(H1N1)pdm09, 14% (95%IC: 6-21%) e GMT 15 (13-17).

A análise da seroprevalência nos grupos etários 39-49 e 50-69 anos mostrou que os indivíduos com 50 ou mais anos apresentaram a seroprevalência e os valores de GMT para o subtipo A(H3N2) significativamente mais elevados antes e 30 dias após a vacinação.

Apesar da seroprevalência e dos valores de GMT antes da vacinação serem semelhantes nos grupos de indivíduos com ou sem vacinação nas épocas anteriores; 30 dias após a vacinação, foram significativamente mais elevados para o vírus do

Figura 1 : Estudo de seguimento de uma coorte de adultos vacinados na época de 2017/2018.

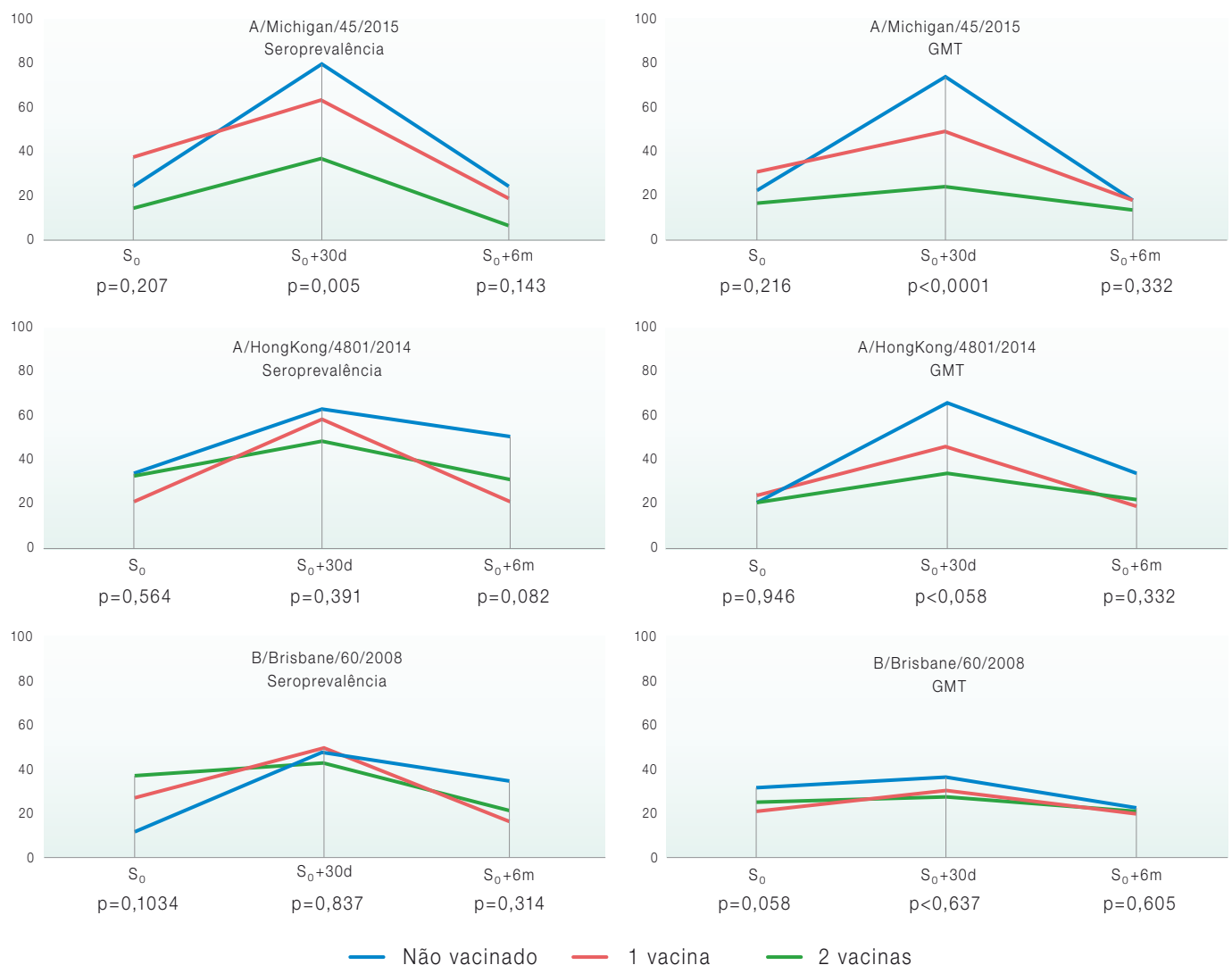


subtipo A(H1N1)pdm09 nos participantes que não se tinham vacinado nas duas épocas anteriores [84% (95%IC: 68-100); GMT 69 (45-106) nos não vacinados vs. 67% (95%IC: 43-91); GMT 46 (29-73) com uma vacina e 84% (95%IC: 68-100); GMT 69 (45-106) com duas vacinas;  $p \leq 0,005$  seroprevalência e  $p < 0,0001$  GMT] (Figura 3). No final da época esta diferença diminuiu, sendo a seroprevalência e os valores de GMT semelhantes aos observados nos participantes que declararam vacinação em épocas anteriores.

A seroconversão foi mais frequente para os vírus do tipo A, 22% para o subtipo A(H1N1) e 23% para o subtipo A(H3N2), comparativamente com o observado para o vírus do tipo B (14%) (Figura 4). A seroconversão foi significativamente mais frequente para os participantes que não se tinham vacinado nas épocas anteriores. A mesma situação foi observada para os indivíduos com títulos de anticorpos inferiores a 1:40 antes da toma da vacina.

Figura 3: Seroprevalência (% HAI $\geq$ 40) e média geométrica do título de anticorpos (GMT) para os vírus que compõem a vacina antigripal trivalente de 2017/2018<sup>a</sup>, antes da toma da vacina ( $S_0$ ), 30 dias após a vacinação ( $S_0+30d$ ) e 6 meses após a vacinação ( $S_0+6m$ ) para a coorte dos em estudo (n=74 adultos vacinados). 74 adultos vacinados de acordo com a vacinação nas duas épocas anteriores (2015/2016 e 2016/2017).  $P \leq 0,05$  -valor de significância estatística.

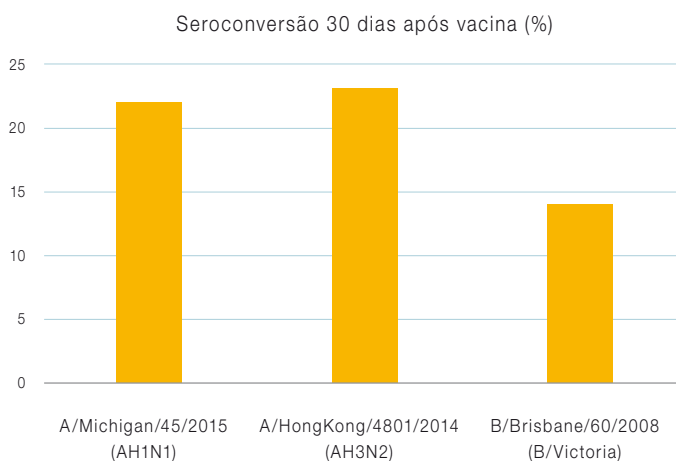
<sup>a</sup> A/Michigan/45/2015 (AH1N1); A/Hong Kong/4801/2014 (AH3N2); B/Brisbane/60/2008 (B/Victoria).





**Figura 4:** Seroconversão (aumento de 4 vezes o título de anticorpos 30 dias após a toma da vacina) para os vírus que compõem a vacina antigripal trivalente de 2017/2018<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> A/Michigan/45/2015 (AH1N1); A/Hong Kong/4801/2014 (AH3N2); B/Brisbane/60/2008 (B/Victoria).



Foi observado um número reduzido de casos de síndrome gripal, declarados em 13 (18%) dos participantes (Tabela 1). Foi apenas confirmado laboratorialmente um caso de gripe associado ao subtipo A(H3N2) para o qual o indivíduo tinha um título de anticorpos  $\text{HAI} < 40$ , 30 dias após a vacinação. Em 6 casos foi confirmada a infeção por outros vírus respiratórios nomeadamente: 2 rinovírus, 1 vírus sincicial respiratório e 3 coronavírus.

## \_Discussão

Foi estudada a resposta imunitária conferida pela vacinação antigripal numa população de adultos saudáveis e trabalhadores ativos do INSA, grupo de profissionais de saúde para ao quais a vacinação está indicada pela norma da vacinação contra a gripe de 2017, da DGS. Foi igualmente avaliada a imunidade no final da época 2017/2018, 6 meses após a vacinação. O estudo permitiu avaliar a resposta imunitária para as variáveis: idade e toma da vacina nas duas épocas anteriores (2015/2016 e/ou em 2016/2017). Foi observado que a vacina trivalente administrada em 2017/2018 conferiu um au-

mento da seroprevalência, e do título dos anticorpos para os 3 vírus incluídos na vacina. Foi igualmente observada a seroconversão, 30 dias após a toma da vacina, para ambos os tipos e subtipos contemplados na vacina. A seroconversão foi significativamente superior nos indivíduos que não tinham efetuado a toma da vacina nas duas épocas anteriores. No início do estudo, antes da administração da vacina antigripal, a seroprevalência era mais elevada para o vírus do subtipo A(H3N2), resultado que poderá estar associado a uma maior exposição a este subtipo, que foi o detetado em 99% dos casos de gripe na época de 2016/2017 (14). Trinta dias após a vacinação, foi para os subtipos A(H1N1) e A(H3N2) que a seroprevalência, os valores de GMT e a seroconversão foram mais elevadas, comparativamente com o observado para o vírus da gripe do tipo B, este facto poderá estar associado a uma maior exposição aos vírus do tipo A ao longo da vida dos participantes no estudo (15) (16) (17).

## \_Conclusões

O estudo demonstrou que a vacinação antigripal promoveu a resposta imunitária, 30 dias após a vacinação, para os vírus contemplados na vacina trivalente de 2017/2018. A idade e a toma de vacinas nas 2 épocas anteriores podem influenciar a resposta imunitária à vacinação. Foi observada uma seroprevalência mais elevada para o subtipo A(H3N2), o vírus predominante na época anterior ao estudo, nos indivíduos com mais idade e com maior probabilidade de contacto anterior com este vírus. Os valores de seroprevalência e dos títulos de anticorpos foram tendencialmente mais elevados nos participantes que não se tinham vacinado nas duas épocas anteriores. São necessários mais estudos que permitam esclarecer esta possível associação. Foi observado que ao fim de 6 meses a seroprevalência e os valores de GMT diminuíram para valores próximos dos observados antes da vacinação, o que suporta a necessidade da vacinação anual, de acordo com a norma da vacinação contra a gripe da DGS (3) no início de cada outono/inverno. A especial recomendação da vacina à população de risco, com mais de 64 anos, e o aumento da cobertura vacinal neste grupo constitui um dos

e o aumento da cobertura vacinal neste grupo constitui um dos objetivos do Plano Nacional de Saúde 2020 (18) para ir ao encontro das recomendações para os países da União Europeia, e da meta estabelecida de 75% de cobertura vacinal na população de risco (idade superior a 64 anos) (19). O seguimento de coortes de indivíduos vacinados permitirá consolidar os resultados deste estudo e contribuir para o conhecimento da resposta imunitária à vacinação contra a gripe em cada época, em indivíduos frequentemente vacinados. O desenvolvimento de estudos serológicos pelo INSA, no âmbito da suas competências no Programa Nacional de Vigilância da Gripe (10) são hoje uma fonte de informação indispensável para fundamentar a escolha dos vírus recomendados para a composição da vacina contra a gripe do inverno seguinte, um contributo para a gestão das campanhas de vacinação no que diz respeito à identificação dos grupos prioritários e à calendarização da campanha anual de vacinação.

### Agradecimentos

À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Aos Colegas do INSA que participaram no estudo.

À Dra. Isabel Picanço coordenadora dos TSACSP e aos Colegas TSACSP que realizaram as colheitas de sangue.

À Anabela Cordeiro do DSO pelo apoio administrativo.

Ao Laboratório de Referência da Gripe da Organização Mundial de Saúde (WHO collaborating centre) do Francis Crick Institute em Londres pelo fornecimento do vírus de referência.

### Referências bibliográficas:

- (1) Petrie JG, Ohmit SE, Johnson E, Truscon R, Monto AS. Persistence of Antibodies to Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase Following One or Two Years of Influenza Vaccination. 2015;212.
- (2) WHO. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. World Health Organization, 2011;153.
- (3) Orientação nº 018/2017. Vacinação contra a gripe. Época 2017/2018. DGS, 2017.
- (4) (WHO) WHO. WHO recommendations on the composition of influenza virus vaccines.
- (5) Kleina SL, Marriott I, Fish EN. Sex-based differences in immune function and responses to vaccination. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2014;109(1):9–15.
- (6) Skowronski DM, Tweed SA, Serres G De. Rapid Decline of Influenza Vaccine – Induced Antibody in the Elderly : Is It Real , or Is It Relevant ? 2018;197(July).
- (7) WHO. WHO Public Health Research Agenda for Influenza. Organization WH, editor. Geneva;
- (8) Decreto - Lei nº 27/2012, Diário da República, 1ª série, de 8 de fevereiro de 2012
- (9) Portaria nº 162/2012, Diário da República, 1ª série, nº 99 de 22 de maio de 2012.
- (10) Decreto - Lei nº 307/1993, Diário da República, 1ª série, de 1 de setembro de 1993.
- (11) Epiconcept. Influenza monitoring of vaccine effectiveness (I-Move Project) [Internet]. [cited 2018 Sep 1]. Available from: <https://sites.google.com/site/epiflu/about-i-move/project-background>
- (12) Cox RJ. Correlates of protection to influenza virus, where do we go from here? Hum Vaccines Immunother. 2013;9(2):405–8.
- (13) Problems RH. COMMISSION IMPLEMENTING DECISION (EU) 2018/945 of 22 June 2018 on the communicable diseases and related special health issues to be covered by epidemiological surveillance as well as relevant case definitions. 2018;(2119):1–74.
- (14) Guiomar R, Pechirra P, Cristóvão P, Costa I, Conde P, Rodrigues AP, et al. Programa Nacional de Vigilância da Gripe.
- (15) Guerche-séblain C El, Cains S, Paget J, Vanhems P, Schellevis F. Epidemiology and timing of seasonal influenza epidemics in the Asia-Pacific region , 2010 – 2017: implications for influenza vaccination programs. 2019;1–10.
- (16) Cains S, Spreuwenberg P, Kuszniarz GF, Rudi JM, Owen R, Pennington K, et al. Distribution of influenza virus types by age using case-based global surveillance data from twenty-nine countries, 1999–2014. 2018;
- (17) Cains S, Alonso WJ, Séblain CE, Schellevis F, Paget J, Pasteur S. The spatiotemporal characteristics of influenza A and B in the WHO European Region: can one define influenza
- (18) Direção-Geral da Saúde. Plano Nacional de Saúde: revisão e extensão a 2020. 2015;38. Available from: <http://pns.dgs.pt/files/2015/06/Plano-Nacional-de-Saude-Revisao-e-Extensao-a-2020.pdf>
- (19) Report T. Seasonal influenza vaccination and antiviral use in EU / EEA Member States. 2018.