

Ερευνητική εργασία

Ιολογική επιτήρηση της γρίπης στη Β. Ελλάδα, 2017/18

Αγγελική Μελίδου, Μαρία Εξηντάρη, Γεωργία Γκιούλα, Σουζάνα Βεργκίζι-Νικολακάκη, Μαρία Χριστοφορίδη, Αναστασία Ανδρεοπούλου, Θεανώ Γεωργακοπούλου, Άννα Παπά-Κονιδάρη
Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρικό Τμήμα, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
(Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Γρίπης Β. Ελλάδος)



Περίληψη

Η γρίπη απασχολεί τη δημόσια υγεία με τις ετήσιες επιδημίες της. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του εργαστηριακού ελέγχου της γρίπης όπως πραγματοποιήθηκε στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Γρίπης Β. Ελλάδος κατά το 2017-2018. Από την 40ή εβδομάδα 2017 έως και την 20ή του 2018, ελέγχθηκαν 740 δείγματα από περιπατητικούς ασθενείς με γριπώδη συνδρομή (δείγματα Sentinel) και από νοσηλευόμενους σε απλούς θαλάμους και σε ΜΕΘ.

Ανιχνεύθηκαν με μοριακές μεθόδους 181 δείγματα, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε κυτταρικές σειρές MDCK-SIAT και σε εμβρυοφόρα ωά όρνιθας. Ανευρέθησαν τρεις τύποι/υπότυποι ιών γρίπης, A(H1N1)pdm09, A(H3N2) και Β. Επικράτησαν κατά πολύ οι ιοί τύπου Β, σειράς Yamagata (75,1% των θετικών), ενώ η κυκλοφορία ιών A(H3N2) ήταν ελαχίστη (3,3% των θετικών).

Καταγράφηκαν 15 θάνατοι, 5 οφειλόμενοι σε γρίπη A(H1N1)pdm09 και 10 σε Β. Ο γενικός Μ.Ο.

ηλικίας ήταν 63,3 έτη και ειδικότερα για τα περιστατικά (A(H1N1)pdm09 ήταν 55 έτη, ενώ για τα Β 67,5 έτη. Για την πλειοψηφία των θανάτων αναφέρονται προϋπάρχουσες παθολογικές καταστάσεις.

Ακολούθησε μοριακή ανάλυση της αιμοσυγκολλητίνης αντιπροσωπευτικών στελεχών, ώστε να διερευνηθεί η βιολογική εξέλιξη των κυκλοφορούντων ιών γρίπης και να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα του εμβολίου. Βάσει των μεταλλαγών και των αμινοξικών αντικαταστάσεων που αποκαλύφθηκαν, τα στελέχη A(H1N1)pdm09 παρουσίασαν αντιγονική συγγένεια με το στέλεχος του εμβολίου ενώ τα στελέχη A(H3N2) παρουσίασαν γενετική απόκλιση σε σχέση με αυτό. Τα στελέχη των ιών Β ανήκαν στη σειρά Yamagata, ο οποίος δεν περιλαμβάνόταν στο τριδύναμο εμβόλιο της γρίπης, γεγονός που οδήγησε στην χαμηλή αποτελεσματικότητα του εμβολίου την περίοδο 2017-18. Ανιχνεύθηκαν δύο στελέχη A(H1N1)pdm09 ανθεκτικά στους αναστολείς νευραμινιδάσης (οσελαμιβίρη) με τη μετάλλαξη H275Y.

Όπως συνιστά και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας, η συνεχής επιτήρηση των ιών της γρίπης είναι απαραίτητη σε εθνικό και παγκόσμιο επίπεδο.



Λέξεις κλειδιά

γρίπη, A(H1N1)pdm09, A(H3N2), Β, εμβόλιο, ανθεκτικότητα

Υπεύθυνος αλληλογραφίας

Μαρία Εξηντάρη

Εργαστήριο Μικροβιολογίας,

Ιατρικό Τμήμα,

Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης,

Πανεπιστημιούπολη, 54124 Θεσσαλονίκη

Τηλ.: 2310 999031

E-mail: mexidari@auth.gr

Εργαστηριακή επιτήρηση γρίπης στη Β. Ελλάδα

Το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Γρίπης της Β. Ελλάδας, που εδρεύει στο Β' Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του ΑΠΘ, σε συνεργασία με το ΚΕΕΛΠΝΟ, πραγματοποιεί την εργαστηριακή επιτήρηση της γρίπης στη Β. Ελλάδα.¹ Στο εργαστήριο αποστέλλονται σε εβδομαδιαία βάση αντιπροσωπευτικά δείγματα από ασθενείς με γριπώδη συνδρομή από τα μέλη του δικτύου επιτήρησης του ΚΕΕΛΠΝΟ, καθώς και δείγματα από ασθενείς που προσέρχονται σε εξωτερικά ιατρεία ή νοσηλεύονται σε κλινικές και μονάδες εντατικής θεραπείας των νοσοκομείων της Β. Ελλάδας. Εβδομαδιαίες εκθέσεις με τα αποτελέσματα της επιτήρησης αποστέλλονται στο ΚΕΕΛΠΝΟ, και στον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας / ECDC σε όλη τη διάρκεια της περιόδου (εβδομάδες 40/2017-20/2018).

Εργαστηριακές μέθοδοι

Τα δείγματα εξετάστηκαν για ιούς γρίπης με τις εξής μεθόδους:²⁻⁴ α) Μοριακές τεχνικές Real time RT-PCR για την ανίχνευση των τύπων Α και Β και των υποτύπων A(H3N2), A(H1N1)pdm09, B/Yamagata και B/Victoria, β) Καλλιέργεια σε κυτταρικές σειρές MDCK-SIAT1, γ) Καλλιέργεια σε εμβρυοφόρα αβγά όρνιθας, δ) Δοκιμασία αιμοσυγκόλλησης με την οποία ταυτοποιήθηκαν οι απομονωθέντες ιοί, ε) Δοκιμασία αναστολής αιμοσυγκόλλησης με την οποία τυποποιήθηκαν οι ταυτοποιηθέντες ιοί χρησιμοποιώντας ειδικούς αντιορούς του WHO, ε) Γονιδιακή ανάλυση του γονιδίου της αιμοσυγκολλητίνης με αλληλούχηση κατά Sanger, δ) Μοριακός έλεγχος ευαισθησίας των ιών γρίπης στην οσελαμιβίρη (SNP assay για τους ιούς A(H1N1)pdm09 και αλληλούχηση του γονιδίου της νευραμινιδάσης για τους ιούς A(H3N2) και Β).

Ιολογικός έλεγχος

Η επιτήρηση της Γρίπης στη Β. Ελλάδα άρχισε την 40ή εβδομάδα του 2017 και ολοκληρώθηκε την 20ή εβδομάδα του 2018. Στο διάστημα αυτό εστάλησαν στο Εθνικό Κέντρο Γρίπης της Β. Ελλάδος 740 δείγματα (φαρυγγικά εκπλύματα, επιχρίσματα ή δείγματα από το κατώτερο αναπνευστικό) ασθενών υπόπτων για γρίπη. Τα 52 δείγματα προέρχονταν από τα το δίκτυο επιτήρησης Sentinel και αφορούσαν περιπατητικούς ασθενείς με γριπώδη συνδρομή, τα δε υπόλοιπα 688 προέρχονταν από νοσηλευόμενους σε νοσοκομεία της Β. Ελλάδας.

Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν για παρουσία ιού γρίπης Α και Β. Θετικά ήταν 181 (24,5%) και 559 αρνητικά. Από τα θετικά, 45 (24,9%) τυποποιήθηκαν ως γρίπη Α και 136 (75,1%) ως γρίπη Β, εξ αυτών 2 συλλοιμώξεις Α(Η3Ν2) και Β. Η υποτυποποίηση των ιών γρίπης Α έδειξε ότι 39 (86,7% των Α, 21,5% του συνόλου των θετικών) στελέχη ήταν Α(Η1Ν1)ρδm09, ενώ 6 στελέχη ήταν Α(Η3Ν2) (13,3% των Α, 3,3% του συνόλου των θετικών). Η υποτυποποίηση των ιών γρίπης Β έδειξε ότι όλα τα κυκλοφορούντα στελέχη ήταν Β/Yamagata. Τα αποτελέσματα αυτά στέλνονται καθημερινά ηλεκτρονικά στο ΚΕΕΛΠΝΟ και εβδομαδιαία στο TESSy. (Πίνακας 1)

Από τα 52 δείγματα προέλευσης Sentinel, διαπιστώθηκαν 3 Α(Η1Ν1)ρδm09, 1 Α(Η3Ν2), 20 Β/Yamagata και 28 αρνητικά για γρίπη. Στους νοσηλευόμενους σε ΜΕΘ, ανιχνεύθηκαν 13 ιοί Α(Η1Ν1)ρδm09, κανένας Α(Η3Ν2), 18 Β/Yamagata ενώ 192 δείγματα ήταν αρνητικά για γρίπη. Από τους νοσηλευόμενους σε κοινούς θαλάμους βρέθηκαν 23 ιοί Α(Η1Ν1)ρδm09, 5 Α(Η3Ν2), 98 Β/Yamagata και 336 δείγματα αποδείχθηκαν αρνητικά για γρίπη. (Πίνακας 1)

Το διάστημα αυτό καταγράφηκαν στη Βόρεια Ελλάδα

συνολικά 15 θάνατοι, κυρίως σε ασθενείς που νοσηλεύονταν σε ΜΕΘ. Από αυτούς, 5 (1/3 των θανάτων) οφείλονταν στον ιό γρίπης Α(Η1Ν1)ρδm09 και 10 στον ιό γρίπης Β (2/3 των θανάτων). Ειδικότερα, από το σύνολο των 39 λοιμώξεων από Α(Η1Ν1)ρδm09, 12,8% κατέληξαν σε θάνατο, ενώ από το σύνολο των 136 Β λοιμώξεων θανατηφόρες ήταν 7,3%. Οι ηλικίες των θανόντων ήταν 39-87 έτη με μέσο όρο 63,3 έτη. Ειδικότερα, στα θανατηφόρα περιστατικά από Α(Η1Ν1)ρδm09 παρατηρήθηκαν ηλικίες 39-79 έτη (Μ.Ο. 55,5 έτη), ενώ οι θανόντες από γρίπη Β είχαν ηλικίες 45-87 (Μ.Ο. 67,5 έτη). Στην πλειοψηφία των θανατηφόρων περιστατικών συνυπήρχαν άλλες υποκείμενες παθολογικές καταστάσεις, ωστόσο μόνον δύο αναφέρονται ως εμβολιασμένοι.

Όσον αφορά την παθογονικότητα των ιών, από τα 39 περιστατικά Α(Η1Ν1)ρδm09 τα 13 (33,3%) νοσηλεύθηκαν σε ΜΕΘ και 5 (12,8%) κατέληξαν, ενώ από τα 136 περιστατικά Β λοιμώξεων τα 19 (14,0%) νοσηλεύθηκαν σε ΜΕΘ και 10 (7,4%) ήσαν θανατηφόρα. Σε σχέση με την ανάγκη νοσηλείας σε ΜΕΘ, οι Α(Η1Ν1)ρδm09 ιοί υπερτερούσαν στατιστικά των Β (p=0,0058), ενώ ως προς τους θανάτους δεν ανευρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0,2823).

Ιοί γρίπης Α(Η1Ν1)ρδm09 και Β που απομονώθηκαν επιτυχώς σε κυτταροκαλλιέργειες MDCK-SIAT1 ή/και εμβρυοφόρα αβγά όρνιθας, έχουν αποσταλεί στο WHO CC του Λονδίνου, για περαιτέρω ανάλυση και για χρήση στην παρασκευή εμβολίου.

Γονιδιακός χαρακτηρισμός κυκλοφορούντων στελεχών ιών γρίπης

Ιοί γρίπης Α(Η1Ν1)ρδm09

Ο γονιδιακός χαρακτηρισμός των φετινών απομονω-

Πίνακας 1

Οι ιοί γρίπης που κυκλοφόρησαν στη Β. Ελλάδα την περίοδο 2017-2018*

	Εξεταστέα	Θετικά	Α (45/181, 24,9%)		Β (136/181, 75,1%)	
			A(H1N1)pdm09	A(H3N2)	Yamagata	Victoria
Sentinel	52	24	3 (12,5%)	1 (4,2%)	20 (83,3%)	0
Νοσηλεία απλή	466	127	23 (18,1%)	5 (3,9%)	99 (78,0%)	0
ΜΕΘ	226	32	13 (40,6%)		19 (59,4%)	0
Σύνολο	740	181	39 (21,5%)	6 (3,3%)	136 (75,1%)	0
Θάνατοι		15	5		10	0

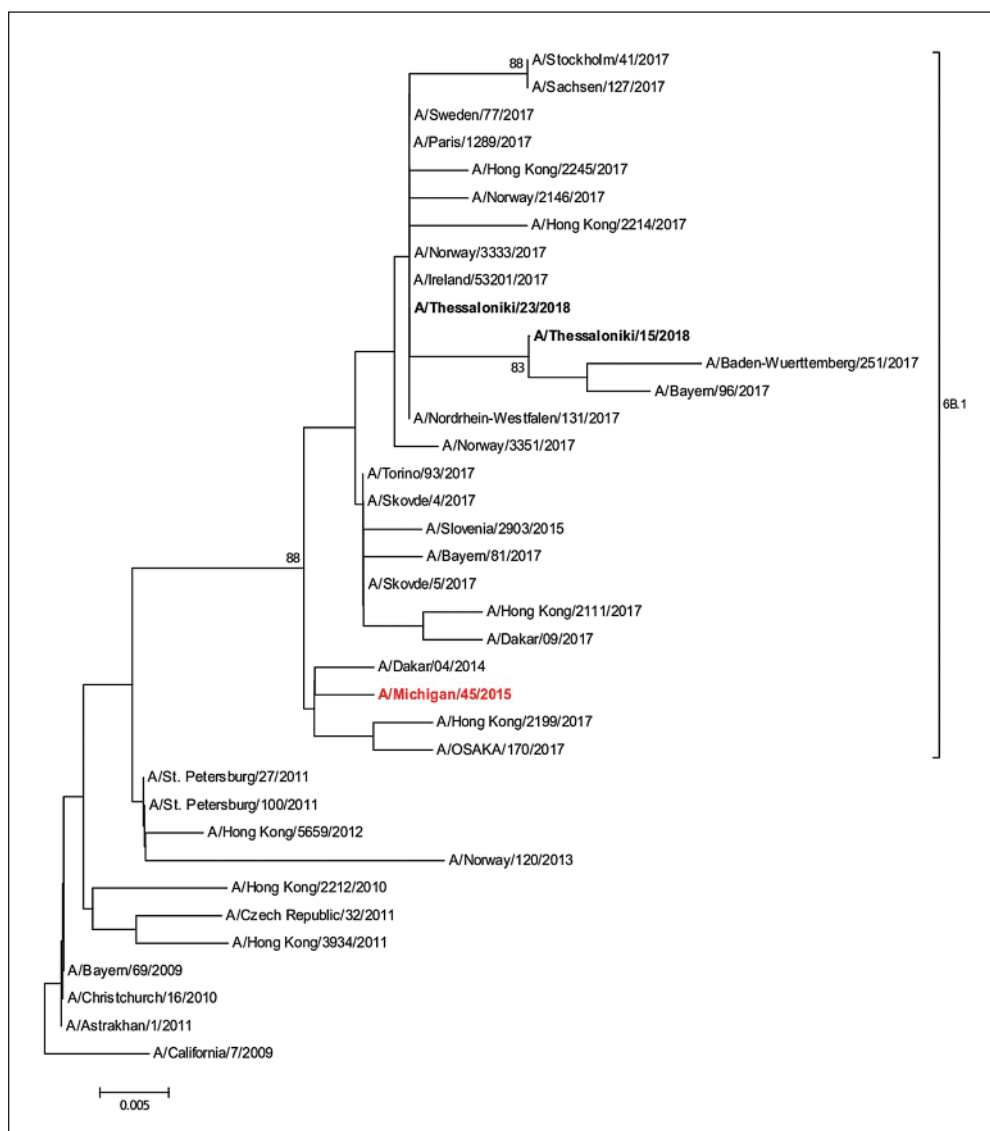
* Οι εκατοστιαίες αναλογίες εκφράζουν τα ποσοστά συμμετοχής των ιών Α(Η1Ν1)ρδm09, Α(Η3Ν2), Β/Υ και Β/Υ στην κάθε κατηγορία δειγμάτων (Sentinel, νοσηλευόμενοι, ΜΕΘ).

θέντων ιών γρίπης υποτύπου A(H1N1)pdm09 έδειξε ότι όλοι ανήκαν στον υποκλάδο 6B.1, αντιπροσωπευτικό στέλεχος της οποίας είναι το στέλεχος του εμβολίου, A/Michigan/45/2015. Χαρακτηριστικές των κυκλοφορούντων στελεχών αμινοξικές αντικαταστάσεις ήταν οι: S74R, S164T και I295V, ενώ διαφοροποιήθηκαν από το στέλεχος του εμβολίου με τις αντικαταστάσεις S183P, E235D και N260D ή N120A στην HA (Εικόνα 1).

Ιοί γρίπης A(H3N2)

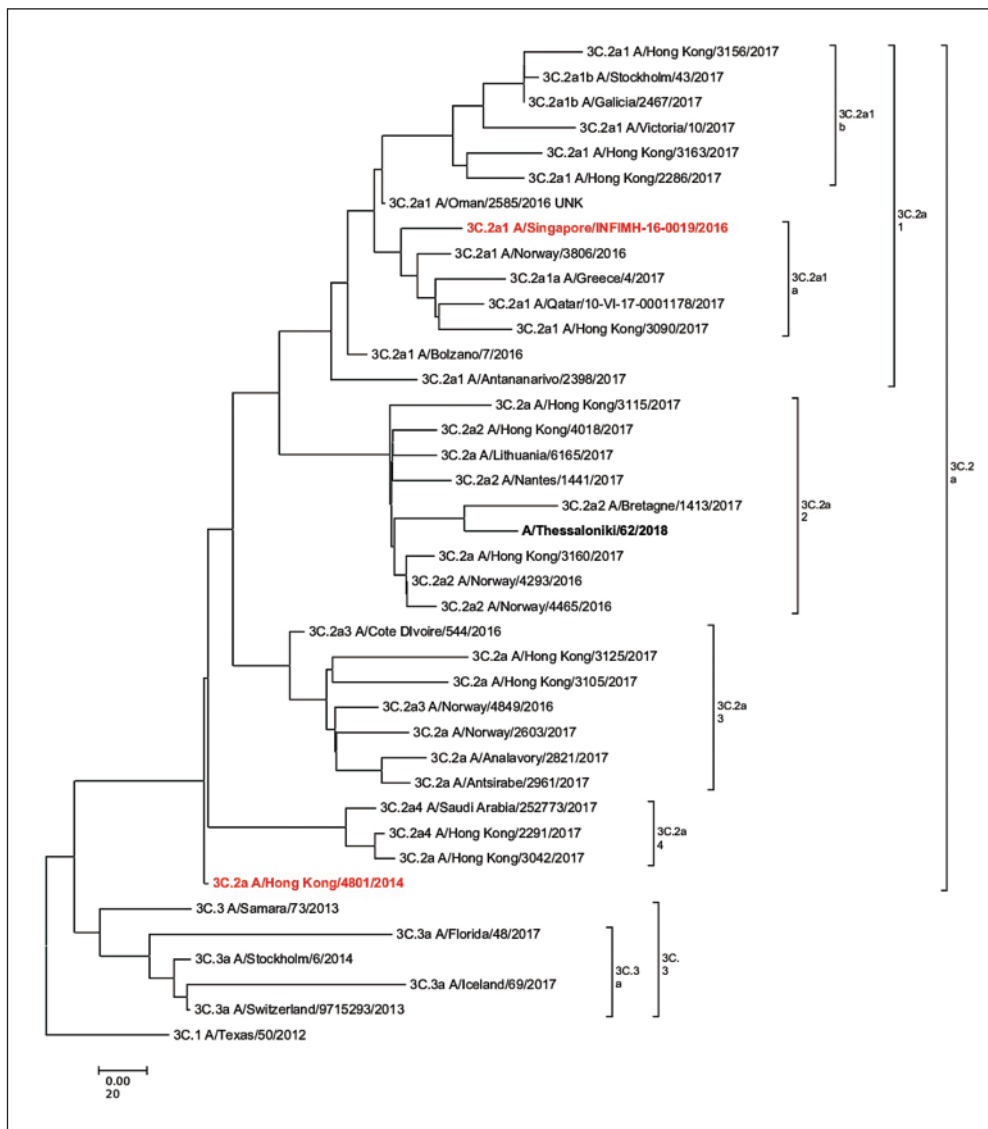
Ο γονιδιακός χαρακτηρισμός των φετινών (2017-2018) κυκλοφορούντων ιών γρίπης υποτύπου A(H3N2) έδειξε ότι ανήκαν στον γονιδιακό κλάδο 3C.2a και υποκλάδο 3C.2a2. Στον κλάδο 3C.2a ανήκε

και το A/Hong Kong/4801/2014, που ήταν και το στέλεχος του εμβολίου (βλ. παράρτημα). Σε σχέση με τον ιό του εμβολίου A/Hong Kong/4801/2014, οι ιοί της γρίπης A(H3N2) εμφάνισαν αυξημένο αριθμό αμινοξικών αντικαταστάσεων τόσο στις περιοχές σύνδεσης αντισωμάτων (antibody binding site) όσο και σε άλλες θέσεις, υποδεικνύοντας γονιδιακή μεταβολή, λόγω της εξέλιξης του ιού. Μεταξύ των αμινοξικών αντικαταστάσεων που διέκριναν τη γονιδιακή σύσταση των κυκλοφορούντων ιών γρίπης από αυτή του ιού του εμβολίου ήταν οι E62K and A212T στην HA. Το στέλεχος που επιλέχθηκε από τον ΠΟΥ για τη σύσταση του εμβολίου του 2018-2019 είναι το A/Singapore/IF-NIMH-16-0019/2016 που ανήκει στον γονιδιακό υποκλάδο 3C.2a1 (Εικόνα 2).



Εικόνα 1

Φυλογενετική ανάλυση γονιδίου αιμοσυγκολλητίνης (HA) στελεχών εποχικής γρίπης υποτύπου A(H1N1)pdm09 που απομονώθηκαν κατά την περίοδο 2017-2018 στη Β. Ελλάδα.



Εικόνα 2 Φυλογενετική ανάλυση γονιδίου αιμοσυγκολλητίνης (HA) στελεχών εποχικής γρίπης υποτύπου Α(H3N2) που απομονώθηκαν κατά την περίοδο 2017-2018 στη Β. Ελλάδα.

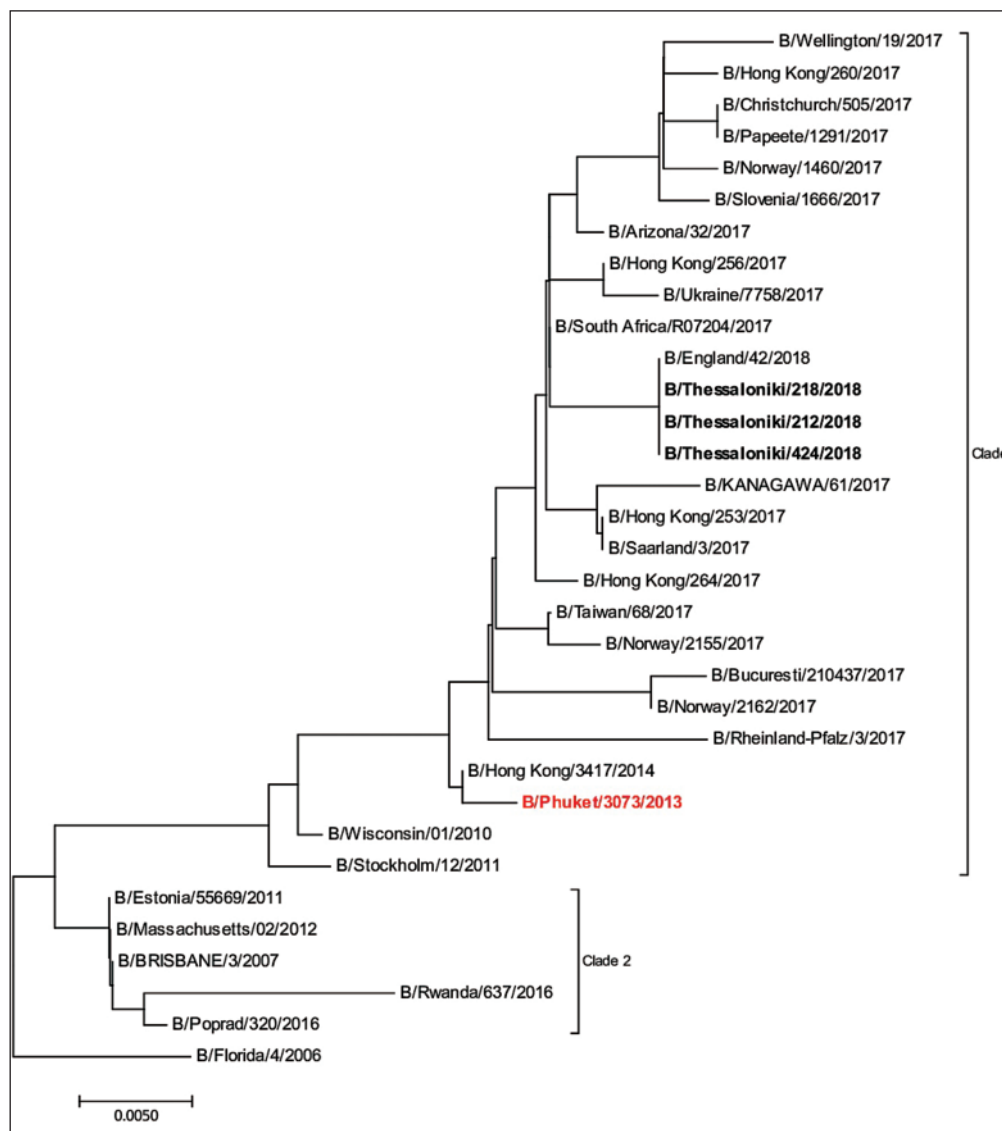
Ιοί γρίπης Β

Ο γονιδιακός χαρακτηρισμός των φετινών απομονωθέντων ιών γρίπης Β έδειξε ότι όλοι ανήκαν στην σειρά Yamagata και στον κλάδο 3, αντιπροσωπευτικό στέλεχος του οποίου είναι το στέλεχος του τετραδύναμου εμβολίου, B/Phuket/3073/2013. Χαρακτηριστικές των κυκλοφορούντων στελεχών αμινοξικές αντικαταστάσεις ήταν οι L172Q και M251V στην HA. Αρκετές αμινοξικές αντικαταστάσεις σε σύγκριση με το στέλεχος του εμβολίου παρατηρήθηκαν στην νευραμινιδάση των κυκλοφορούντων στελεχών. Κανένα στέλεχος ιού Β της σειράς Victoria, που περιλαμβάνεται στο τριδύναμο εμβόλιο, δεν κυκλοφόρησε στη Β. Ελλάδα (Εικόνα 3).

Αντιγονικός χαρακτηρισμός κυκλοφορούντων στελεχών γρίπης

Σχετικά με τον αντιγονικό χαρακτηρισμό των ιών Α(H3N2), δεν κατέστη δυνατόν να επιτευχθούν επαρκείς τίτλοι των στελεχών ιών Α(H3N2) σε κύτταρα MDCK-SIAT1 στην πλειονότητα των στελεχών, φαινόμενο που παρατηρήθηκε και στις προηγούμενες περιόδους σε παγκόσμιο επίπεδο. Ένα μόνο στέλεχος χαρακτηρίστηκε επιτυχώς ως A/Hong Kong/4801/2014.

Ελέγχθηκε με δοκιμασία αναστολής αιμοσυγκόλλησης ένα αντιπροσωπευτικό στέλεχος γρίπης τύπου Α(H1N1)pdm09, και βρέθηκαν να προσομοιάζει αντιγονικά με το στέλεχος του εμβολίου A/Michigan/45/2015.



Εικόνα 3 Φυλογενετική ανάλυση γονιδίου αιμοσυγκολλητίνης (HA) στελεχών εποχικής γρίπης τύπου B/Yamagata που απομονώθηκαν κατά την περίοδο 2017-2018 στη Β. Ελλάδα.

Ελέγχθηκαν με δοκιμασία αναστολής αιμοσυγκόλλησης 5 αντιπροσωπευτικά στελέχη γρίπης τύπου B. Όλα τα κυκλοφορούντα στελέχη B ήταν παρόμοια με το στέλεχος του τετραδύναμου εμβολίου B/Phuket/3073/2013.

Επιτήρηση ευαισθησίας στα αντιικά φάρμακα

Στο Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Γρίπης Β. Ελλάδος και στο συνεργαζόμενο με τον ΠΟΥ κέντρο αναφοράς στο Λονδίνο ελέγχθηκαν συνολικά 36 κλινικά δείγματα θετικά στη γρίπη (2 στελέχη A(H3N2), 30 A(H1N1)

pdm09 και 5 B), με αλληλούχιση (sequencing) του γονιδίου της νευραμινιδάσης και real time SNP genotyping assay. Σε δύο από τα ανωτέρω δείγματα A(H1N1)pdm09 βρέθηκε η μετάλλαξη H275Y που προσδίδει ανθεκτικότητα στους αναστολείς νευραμινιδάσης (οσελταμιβίρη, ζαναμιβίρη).⁵ Και τα δύο δείγματα προέρχονταν από ασθενείς που είχαν λάβει θεραπεία με οσελταμιβίρη.

Συμπεράσματα

Στη Βόρεια Ελλάδα, όπως και στην υπόλοιπη Ελλάδα και σε όλο το βόρειο ημισφαίριο, κυκλοφόρησαν και

οι 3 τύποι ιού γρίπης, με επικρατέστερο τον Β και συγκεκριμένα τον υπότυπο Yamagata.⁶ Σε σύγκριση με τα στελέχη του εμβολίου κατά το 2017/18, υπήρχε αναντιστοιχία του στελέχους Β που συμπεριλαμβανόταν στο τριδύναμο εμβόλιο, καθώς το στέλεχος του εμβολίου ήταν το Β/Victoria.⁷ Τα στελέχη Α(H1N1)pdm09 παρουσίαζαν αντιγονική συγγένεια με αυτά του εμβολίου, ενώ παρατηρήθηκε γονιδιακή απόκλιση των στελεχών Α(H3N2) σε σχέση με το στέλεχος του εμβολίου, που πιθανώς οδήγησε στην χαμηλή αποτελεσματικότητά του.⁷⁻¹⁰ Ανιχνεύθηκαν δύο στελέχη ιών γρίπης Α(H1N1)pdm09 ανθεκτικά στην οσελταμιβίρη.

Το 2018/19 ο ΠΟΥ πρότεινε την αλλαγή του στελέχους Α(H3N2), ώστε να περιλαμβάνει τα διαφορετικά γενετικά στελέχη, καθώς και του Β/Victoria ώστε να περιλαμβάνει το νέο στέλεχος που κυκλοφόρησε στην Ευρώπη κατά την περίοδο 2017/18 και το οποίο είναι αντιγονικά διαφορετικό από όλα τα προηγούμενα στελέχη ιών γρίπης Β.⁹⁻¹¹ Τέτοιο στέλεχος Β/Victoria δεν ανιχνεύθηκε στη Β. Ελλάδα. Λόγω της γονιδιακής και αντιγονικής ποικιλομορφίας και των συχνών αλλαγών των ιών γρίπης, η συνεχής επιτήρηση σε ιολογικό επίπεδο είναι απαραίτητη.



Summary

Virological surveillance of influenza in North Greece, 2017/18

Angeliki Melidou, Maria Exindari, Georgia Gioula, Suzana Vergkizi-Nikolakaki, Maria Christoforidi, Anastasia Andreopoulou, Theano Georgakopoulou, Anna Papa-Konidari

Department of Microbiology, School of Medicine, Aristotle University of Thessaloniki (National Influenza Centre for N. Greece)

Influenza is an important issue of public health, due to its yearly outbreaks. The present study presents the results of influenza laboratory testing performed by the National Influenza Centre for N. Greece during the 2017-18 season. From the 40th week 2017 to the 20th 2018 740 specimens were tested. The specimens belonged to ILL patients (Sentinel surveillance system) as well as to patients hospitalised in wards and ICUs.

One hundred eighty one positive samples were detected and they were then cultured in MDCK-SIAT cells and in embryonated hen eggs. The detected viral types/subtypes were A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B. Type B Yamagata lineage viruses strongly predominated (75% of positives), while the circulation of A(H3N2) viruses was very small (3.3% of positives).

Fifteen fatalities were reported. Out of them, 5 were caused by A(H1N1)pdm09 and 10 by B viruses. The overall mean age was 63.3 years. The specific mean ages were 55 and 67.5 years for A(H1N1)pdm09 and B viruses respectively. For most of the fatal cases pre-existing medical conditions were reported.

The molecular analysis of the haemagglutinin of representative strains was performed in order to investigate the viral evolution and to evaluate the vaccine effectiveness. The revealed mutations and amino acid substitutions indicate an antigenic affinity of the A(H1N1)pdm09 to the vaccine strain and an antigenic divergence of the A(H3N2) strains from it. The strains belonged

to Yamagata lineage, which was not included in the trivalent vaccine of the 2017-18 influenza season, thus resulting to low vaccine effectiveness. Furthermore, the molecular analysis revealed two A(H1N1)pdm09 strains having the H275Y mutation leading to viral resistance to neuraminidase inhibitors (oseltamivir).

As suggested by the WHO, constant surveillance of influenza viruses is necessary at national and global level.



Key words

influenza, A(H1N1)pdm09, A(H3N2), B, vaccine, resistance

Βιβλιογραφία

1. World Health Organisation(WHO). Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS). Geneva. Available from: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/en.
2. Melidou A, Exindari M, Gioula G, Chatzidimitriou D, Pierroutsakos Y, Diza-Mataftsi E. Molecular and phylogenetic analysis and vaccine strain match of human influenza A(H3N2) viruses isolated in Northern Greece between 2004 and 2008. *Virus Res.* 2009 Nov;145(2):220-6.
3. Melidou A, Exindari M, Gioula G, Malisiovas N. Severity of the two post-pandemic influenza seasons 2010-11 and 2011-12 in Northern Greece. *Hippokratia.* 2013 Apr;17(2):150-2.
4. European Centre for Disease Prevention and Control(ECDC). Laboratory surveillance of influenza [February 2018]. Available from: <https://ecdc.europa.eu/en/about-us/networks/disease-and-laboratory-networks/erlinet-lab-surveillance-influenza>.
5. World Health Organisation(WHO). Summary of neuraminidase amino acid substitutions associated with reduced inhibition by neuraminidase inhibitors (NAI) 2016. Available from: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/antiviral_susceptibility/avwg2014_nai_substitution_table.pdf.
6. Adlhoch C, Snacken R, Melidou A, Ionescu S, Penttinen P. Dominant influenza A(H3N2) and B/Yamagata virus circulation in EU/EEA, 2016/17 and 2017/18 seasons, respectively. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin.* 2018 Mar;23(13).
7. World Health Organisation(WHO). Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2017-2018 northern hemisphere influenza season 2017. Available from: http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201703_recommendation.pdf.
8. Rondy M, Kissling E, Emborg HD, Gherasim A, Pebody R, Trebbien R, et al. Interim 2017/18 influenza seasonal vaccine effectiveness: combined results from five European studies. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin.* 2018 Mar;23(9).
9. World Health Organization(WHO). Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Northern Hemisphere 2018-2019 2018. Available from: https://www.crick.ac.uk/sites/default/files/2018-07/crick_feb2018_report_for_the_web.pdf.
10. World Health Organisation(WHO). Seasonal Influenza in the WHO European Region, 2017-2018 early season 2018. Available from: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/360239/EuroInfluenzaSitAnalysis_2017-18.pdf.
11. World Health Organisation (WHO). Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2018-2019 northern hemisphere influenza season 2018. Available from: http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201802_recommendation.pdf?ua=1