

Respon Imun terhadap Vaksin Influenza pada Remaja

Adolescent Immune Response to Influenza Vaccine

Meita Dhamayanti, Kusnandi Rusmil, Ponpon Idjradinata

Departemen Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran/Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin Bandung

ABSTRAK

Influenza merupakan penyakit yang mudah menular dengan mortalitas dan morbiditas tinggi serta sering menimbulkan kejadian luar biasa, epidemi, dan pandemi. Pada anak sekolah, influenza menyebabkan tingginya angka absensi dan remaja merupakan sumber penularan terbesar. Penelitian dilakukan untuk menilai respons imun terhadap vaksin influenza pada kelompok remaja 12–18 tahun pada bulan Juni–September 2008, di Puskesmas Garuda Bandung. Desain dilakukan dengan intervensional, longitudinal, acak sederhana, dan tersamar tunggal. Vaksin influenza yang mengandung 3 jenis virus A/H1N1, A/H3N2 dan B, disuntikkan intramuskular. Pengambilan darah dilakukan pra dan *pasca* vaksinasi. Pemeriksaan kadar antibodi dilakukan dengan metode hemaglutinasi inhibisi (HI). Respons imun dinilai berdasarkan nilai serokonversi, dan peningkatan *geometric mean titer* (GMT). Subjek dibagi 2 kelompok, 69 (52,7%) remaja pertengahan (12–15 tahun) dan 62 (47,3%) remaja akhir (16–18 tahun). Semua subjek telah mempunyai kadar antibodi protektif $HI \geq 1:40$ pascavaksinasi. Nilai serokonversi kedua kelompok berbeda bermakna pada pra ($p=0,02$) dan pascavaksinasi ($p=0,02$). Serokonversi terhadap virus A/H3N2 antara remaja pertengahan dan akhir berbeda bermakna pada pascavaksinasi ($p=0,02$). Pada pra dan pascavaksinasi terdapat peningkatan GMT bermakna terhadap ketiga jenis virus influenza (Zw 9,73; 9,19; 9,59 dan $p=0,00$). Simpulan, vaksinasi influenza pada remaja menghasilkan kadar protektif. Respons imun remaja pertengahan dan akhir tidak berbeda, namun remaja pertengahan tampak lebih responsif.

Kata Kunci: Influenza, remaja, respons imun, vaksin

ABSTRACT

As a contagious disease, influenza can cause seasonal outbreaks, epidemics and pandemics resulting high mortality and morbidity. Adolescents are the major source of transmission, resulting in high rates of absenteeism in school-age children. The aim of this study was to assess the immuneresponse of adolescent toward influenza vaccine. The interventional, longitudinal, simple randomized, single blind study was conducted to 12–18 years old adolescents, in Garuda Public Health Center Bandung, on June to September 2008. Influenza vaccine consists of 3 virus type A/H1N1, A/H3N2 and B was injected intramuscularly. Blood samples was taken pre and post vaccination. Antibody titer was measured using hemagglutination-inhibition assays. The immune response was determined based on the seroconversion rate and increase in geometric mean titer (GMT). The subjects were divided into two age groups, 69 (52,7%) middle (12–15 years) and 62 (47,3%) late adolescents (16–18 years). All of the subjects had post vaccination antibody titers $HI \geq 1:40$. The seroconversion rate between groups were significantly different ($p=0,02$ and $p=0,02$). The seroconversion to A/H3N2 between groups were significantly different in pre-vaccination ($p=0,02$). Significant difference was found between GMT for three types of influenza virus (Zw 9.73, 9.19, 9.59 and $p=0,00$). In conclusion, vaccination for influenza in adolescent resulted in protective level. Although there is no difference between the middle and late adolescent, middle adolescents seems more responsive to influenza vaccine.

Keywords: Adolescent, immune response, influenza, vaccine

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. 27, No. 2, Agustus 2012; Korespondensi: Meita Dhamayanti. Departemen Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran Bandung, Jl. Dipati Ukur No. 35 Bandung Tel. (022) 2503271 Email: meita_d@yahoo.com

PENDAHULUAN

Penyakit influenza atau lebih dikenal dengan flu, pada anak remaja umumnya tidak berat, tetapi anak remaja sekolah merupakan yang paling sering terkena (1). Populasi remaja cukup besar, menurut *World Health Organization* (1995), seperlima penduduk dunia adalah remaja berusia 10–19 tahun (2). Influenza pada remaja ditinjau dari besarnya populasi dan tingginya aktivitas, merupakan *disease burden*, karena dapat mempengaruhi komunitas.

Seiring dengan perubahan antara anak, remaja, dan dewasa, fungsi fisiologis dan kekebalan tubuh mengalami perubahan pula, sehingga akan menimbulkan perbedaan respons terhadap penyakit (3). Masa remaja terdiri atas 3 periode, remaja awal (10–12 tahun) disebut juga *tweenage*, pertengahan (13–15 tahun), dan akhir (16–19 tahun) disebut *teenage*, masing-masing mempunyai karakteristik fungsi psikobiologis seiring dengan perubahan seksualnya (4). Respons imun pada tiga periode remaja mempunyai karakteristik yang khas bila dihubungkan dengan jenis kelamin, usia, ras serta genetik, perubahan hormonal, dan aktivitas timus (3). Perubahan yang sangat pesat terutama terjadi pada saat *teenage*. Hal tersebut menyebabkan perbedaan jumlah sel yang berperan dalam membentuk kekebalan tubuh. Beberapa penelitian pada remaja dan dewasa dengan menggunakan *flow cytometry* mengungkapkan bahwa jenis kelamin dan usia mempengaruhi jumlah sel yang berperan terhadap imunitas tubuh (5).

Sebagian besar remaja adalah anak sekolah, sehingga imunisasi influenza pada anak sekolah dapat menurunkan tingkat absensi sekolah (6) dan memberi manfaat tidak langsung dengan menimbulkan kekebalan pada masyarakat sekitar yang tidak diberi vaksinasi (*herd immunity*) (7). Data epidemiologi di Jepang menunjukkan program imunisasi influenza pada anak sekolah mencegah 37.000–49.000 kematian per tahun, atau sekitar satu kematian untuk setiap 420 anak yang dilakukan vaksinasi (8). Program tersebut juga mengurangi angka transmisi infeksi dalam masyarakat dan berperan menurunkan kematian pada usia lanjut (7,8).

Imunisasi influenza merupakan salah satu strategi untuk mengurangi morbiditas dan mortalitas akibat penyakit influenza (9). Vaksin influenza yang beredar berdasarkan rekomendasi WHO terdiri atas tiga tipe virus yaitu dua subtipe A dan satu tipe B (9). Virus influenza mudah sekali berubah (10) sehingga setiap tahun terjadi perubahan galur virus yang terkandung dalam vaksin (9). Saat ini di Indonesia sudah digalakkan program imunisasi terutama pada anak yang termasuk dalam Program Pengembangan Imunisasi (PPI). Di samping itu, banyak usaha imunisasi lain yang tidak termasuk dalam PPI (non PPI), salah satunya ialah imunisasi influenza (11). Menurut Satuan Tugas Imunisasi Ikatan Dokter Anak Indonesia (Satgas Imunisasi IDAI), vaksin influenza merupakan salah satu vaksin yang direkomendasikan untuk anak dan remaja saat ini (11). Di Indonesia, hampir sebagian besar remaja belum mendapat imunisasi influenza. Untuk itu program imunisasi pada remaja sangat diperlukan, sehingga perlu diketahui tingkat kekebalan remaja terhadap influenza.

Tingkat kekebalan dapat diketahui berdasarkan respons imun humoral dengan menilai kadar antibodi dalam serum (12). Salah satu pengukuran kadar antibodi serum

terhadap influenza dengan metode hemaglutinasi inhibisi (HI). Kadar antibodi diekspresikan sebagai *geometric mean titer* (GMT) atau kadar rerata geometri. Kriteria untuk tingkat kekebalan protektif terhadap influenza bila kadar antibodi HI $\geq 1:40$. Penilaian respons imun dan efektivitas vaksin dapat diketahui dari nilai serokonversi (*seroconversion rate*), yaitu proporsi perubahan dari seronegatif ke seropositif ialah kadar HI menjadi $\geq 1:40$. Penilaian serokonversi lain ditunjukkan dengan kenaikan kadar HI pra dan pascavaksinasi lebih dari empat kali (13). Tujuan penelitian ini untuk mengukur dan membandingkan kadar antibodi hemaglutinin inhibisi virus influenza tipe A dan B, pra dan pasca vaksinasi pada remaja.

METODE

Penelitian eksperimental dengan rancangan acak lengkap, pengamatan berulang (pra dan pascavaksinasi) dilakukan di Puskesmas Garuda Bandung pada bulan Juni–September 2008. Subjek harus memenuhi kriteria yakni usia 12–18 tahun, sehat secara klinis, dan tidak pernah mendapat vaksinasi influenza sebelumnya. Subjek dibagi dalam dua kelompok yaitu remaja pertengahan (12–15 tahun) dan remaja akhir (16–18 tahun).

Subjek diberikan dosis tunggal 0,5 mL vaksin influenza trivalen inaktif (Bio Farma) berisi 15 μ g virus influenza A/Solomon/3/2006(H1N1)-like, A/Hiroshima/52/2005(H3N2)-like, B/Malaysia/2506/2004-like, dengan cara disuntikkan intramuskular. Subjek diambil darah pra dan 28 hari pascavaksinasi, masing-masing sebanyak 4 mL, untuk dilakukan pemeriksaan kadar antibodi dengan metode HI.

Analisis deskriptif dilakukan untuk menghitung ukuran statistik jumlah, persentase, rata-rata, simpang baku GMT, dan nilai serokonversi. Uji *Wilcoxon* dilakukan untuk membandingkan kadar HI antibodi pra dan pascavaksinasi, uji *chi-kuadrat* (χ^2) untuk membandingkan kadar HI antibodi pra dan pascavaksinasi pada kedua kelompok remaja. Penelitian ini telah mendapat persetujuan dari Komite Etik Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran, Bandung

HASIL

Sebanyak 131 subjek telah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusif, Kelompok remaja pertengahan 69 orang (52,7%) dan remaja akhir 62 orang (47,3%), sebagian besar subjek (69,5%) adalah perempuan. Usia rata-rata kelompok remaja pertengahan 14,2 (SD:0,9) tahun dan kelompok remaja akhir 16,3 (SD:0,67) tahun. Sebelum vaksinasi influenza, sebagian besar subjek telah mempunyai antibodikadar proteksi terhadap ketiga tipe virus influenza yakni A/H1N1; A/H3N2; B, masing-masing 85,5%; 90,8%; dan 57,3%. Setelah vaksinasi, kadar antibodi HI seluruh subjek telah mencapai kadar proteksi terhadap virus influenza A. Satu orang subjek kelompok remaja akhir, GMT pascavaksinasi terhadap virus influenza B tidak mencapai kadar proteksi. Berdasarkan uji *chi-kuadrat* (χ^2), kadar proteksi pra dan pascavaksinasi tidak ditemukan perbedaan yang bermakna pada kedua kelompok, kecuali pada pravaksinasi terhadap virus A/Hiroshima/52/2005(H3N2)-like. Seluruh subjek telah mengalami peningkatan GMT pra dan pascavaksinasi terhadap ketiga galur virus influenza. Nilai GMT tertinggi pravaksinasi pada

Tabel 1. Distribusi subjek berdasarkan seroproteksi dan GMT

	Pravaksinasi Remaja						p*	Pascavaksinasi Remaja						p*
	Tengah		Akhir		Total			Tengah		Akhir		Total		
	n	%	n	%	n	%		N	%	n	%	n	%	
A/Solomon/3/2006 (H1N1)-like														
HI ≥1:40	61	88,4	51	82,3	112	85,5	0,23	69	100	62	100	131	100	
GMT	85,90		133,33		94,43		0,16	1189,57		1014,19		1106,56		0,18
A/Hiroshima/52/2005(H3N2)-like														
HI ≥1:40	59	85,5	60	96,8	119	90,8	0,02*	69	100	62	100	131	100	
GMT	188,74		211,33		183,21		0,08*	468,41		670,97		564,27		0,09
B/Malaysia/2506/2004-like														
HI ≥1:40	39	56,5	36	58,1	75	57,3	0,50	69	100	61	98,4	130	99,2	
GMT	66,47		76,67		46,72		0,48	572,75		549,51		557,71		0,55

Keterangan: * nilai p berdasarkan uji chi-kuadrat

galur A/Hiroshima/52/2005(H3N2)-like (183,21), sedangkan pascavaksinasi ditemukan pada galur A/Solomon/3/2006(H1N1)-like (1106,56). Pra dan pascavaksinasi GMT terendah didapatkan terhadap B/Malaysia/2506/2004-like (46,72:557,71). Pravaksinasi GMT tertinggi didapatkan pada kelompok remaja akhir terhadap A/Hiroshima/52/2005, (H3N2)-like (211,33), sedangkan pascavaksinasi tertinggi didapatkan pada kelompok remaja pertengahan terhadap A/Solomon iyo/3/2006(H1N1)-like (1189,57). Berdasarkan uji Wilcoxon, perbandingan kadar rata-rata antibodi (GMT) antara pra dan pascavaksinasi tidak tampak perbedaan yang bermakna terhadap ketiga jenis virus influenza (Zw 9,73; 9,19; 9,59, dan p=0,00). Kadar GMT pascavaksinasi meningkat hampir 10 kali dibandingkan pravaksinasi (Tabel 1).

Nilai serokonversi tertinggi pada kelompok remaja pertengahan terhadap virus A/Solomon/3/2006(H1N1)-like, ditinjau dari perubahan seronegatif ke seropositif dan kenaikan kadar empat kali, masing-masing 88,4% dan 94,2%. Pada kedua kelompok didapatkan perbedaan nilai serokonversi yang secara statistik bermakna terhadap A/Hiroshima/52/2005(H3N2)-like (p=0,02) dan B/Malaysia/2506/2004-like (p=0,02) (Tabel 2).

Tabel 2. Distribusi subjek dengan serokonversi dan kenaikan titer empat kali

Jenis virus	Remaja			p*
	Tengah n=69	Akhir n=62	Total n=131	
A/Solomon/3/2006 (H1N1)-like				
Serokonversi	61 (88,4)	51 (82,3)	112 (85,5)	0,23
Kenaikan Titer 4 x	65 (94,2)	54 (87,1)	119 (90,8)	0,13
A/Hiroshima/52/2005(H3N2)-like				
Serokonversi	10 (83,3)	2 (16,7)	12 (9,2)	0,02
Kenaikan Titer 4 x	36 (52,2)	31 (50,0)	67 (51,1)	0,47
B/Malaysia/2506/2004-like				
Serokonversi	30 (43,5)	25 (40,3)	55 (42,0)	0,43
Kenaikan Titer 4 x	60 (87,0)	44 (71,0)	104 (79,4)	0,02

Keterangan: * p berdasarkan uji chi-kuadrat

DISKUSI

Vaksin influenza terdiri dari tiga jenis virus yakni tipe A/H1N1, A/H3N2, dan B. Hal ini dikaitkan dengan keterlibatan virus pada kejadian epidemi dan pandemi (14). Tipe A/H1N1 merupakan penyebab pandemi di Spanyol tahun 1918–1980 yang menyebabkan 40 juta

kematian (15). Tipe A/H3N2 merupakan penyebab pandemi terakhir pada 1968–1969, sebelum munculnya pandemi H1/N1/Swine flu saat ini (16). Virus influenza tipe B hanya menyerang manusia, namun jarang menyebabkan pandemi, sehingga kadar antibodi terhadap tipe ini selalu lebih rendah dibandingkandengan kedua tipe lainnya (10,16). Pada penelitian ini GMT pra dan pascavaksinasi terendah didapatkan pada tipe B/Malaysia/2506/2004-like.

Sebelum diberikan vaksin influenza, hampir sebagian besar remaja telah mempunyai antibodi protektif terhadap ketiga jenis virus influenza. Hal ini dapat diartikan bahwa remaja merupakan populasi yang paling mudah terinfeksi. Pada penelitian ini sebagian besar subjek pravaksinasi telah mempunyai kadar proteksi, tetapi masih ada yang belum terlindungi, sehingga program imunisasi influenza masih perlu dilakukan pada remaja. Secara umum, imunisasi memberikan manfaat yang cukup besar bila dikaitkan dengan pencegahan pandemik, imunisasi dapat mengurangi terjadinya reassortment.

Keberhasilan imunisasi diukur dengan jumlah subjek yang mempunyai kadar proteksi. Pada penelitian ini, imunisasi influenza diberikan dengan satu dosis saja dan hasilnya hampir semua subjek mengalami peningkatan kadar antibodi mencapai kadar proteksi. Geometric mean titer yang dicapai pada penelitian ini lebih tinggi dibandingkan penelitian di Jepang pada tahun 1996 yang memberikan 2 dosis imunisasi (17). Imunisasi influenza pada penelitian terbukti efektif dengan peningkatan GMT pra dan pascaimunisasi secara bermakna.

Meskipun penelitian ini tidak membandingkan dengan kontrol subjek yang tidak diberikan vaksin, tetapi berdasarkan standar yang dikeluarkan oleh Food and Drugs Analysis (FDA) bahwa vaksin influenza baik digunakan bila nilai serokonversi HI≥1:40 di atas 40% (18). Indikator respons imun ditentukan dengan nilai serokonversi (seroconversion rate), semakin baik vaksin maka makin tinggi nilai serokonversinya. Pada penelitian ini, serokonversi telah mencapai lebih dari nilai standar terhadap ketiga tipe virus yang menunjukkan bahwa imunisasi influenza sangat bermanfaat.

Pada umumnya, respons imun kelompok remaja pertengahan dan remaja akhir mengalami peningkatan terhadap ketiga jenis virus, meskipun perbedaan ini secara statistik tidak seluruhnya bermakna. Respons imun kelompok remaja pertengahan lebih baik dibandingkan denganremaja akhir, namun hanya terhadap A/Hiroshima/52/2005(H3N2)-like pada pravaksinasi.

Kadar HI pravaksinasi pada kelompok remaja pertengahan lebih rendah secara bermakna dibandingkan dengan remaja akhir. Hal ini karena umumnya kelompok remaja pertengahan adalah pelajar SMP yang aktivitas bermain di luar lebih sedikit dibandingkan dengan remaja akhir, sehingga kontak dengan virus influenza lebih sedikit. Hal ini berbeda dengan penelitian di Kenya tentang pengaruh pubertas ditinjau dari derajat kematangan seksual Tanner dan kadar hormon *dihydroepiandrosteron* (DHEA) terhadap kejadian malaria yang menyimpulkan bahwa semakin tinggi derajat kematangan seksual, semakin tinggi kadar hormon DHEA, semakin kecil prediksi malaria (19).

Pada penelitian ini, serokonversi ditinjau dari kadar HI paling sedikit 1:40 maupun peningkatan kadar empat kali, menunjukkan kelompok remaja pertengahan lebih tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok remaja pertengahan lebih responsif terhadap vaksin influenza. Hasil ini sesuai dengan penelitian efek hormon *androepistenediol* (AED) dan DHEA terhadap reaksi tuberkulin pada pubertas, yang menyatakan bahwa kadar hormon seks pada remaja pertengahan lebih tinggi memberikan dampak berupa hasil pemeriksaan tuberkulin lebih banyak yang positif (20). Kadar hormon DHEA mulai meningkat pada usia yang lebih awal, yaitu sekitar usia 7 tahun pada anak laki-laki dan 8 tahun pada perempuan (3). Reseptor sel T dan makrofag yang

mengekspresikan estrogen dan androgen intra dan ekstraselular, berimplikasi langsung terhadap hormon seks pada sistem imun (5). Pengaruh hormon ini terhadap sel B hanya bersifat intraselular, sehingga pengaruh hormon terhadap antibodi akan lebih baik bila diperiksa dengan pemeriksaan respons imun selular (12).

Pada penelitian ini secara keseluruhan respons imun antara remaja pertengahan dan remaja akhir tidak tampak perbedaan yang bermakna. Hal ini mungkin disebabkan beberapa faktor antara lain penentuan kelompok remaja hanya berdasarkan usia. Hasil yang lebih akurat dapat ditentukan berdasarkan derajat kematangan Tanner. Hal ini tidak dapat dilakukan pada penelitian ini, mengingat tempat penelitian ini adalah komunitas bukan di klinik/rumah sakit. Pemeriksaan Tanner perlu memeriksa subjek hingga alat kelamin dan sekitarnya, yang sulit bila dikaitkan dengan etik. Keterbatasan penelitian ini juga tidak memeriksa kadar hormon seks sebagai perbandingan tingkat pubertas. Pengaruh pubertas tidak hanya berdampak terhadap imunitas humoral. Imunitas selular sebaiknya perlu diperiksa juga misalnya dengan pengukuran kadar sitokin. Hasil penelitian ini menyimpulkan, vaksinasi influenza pada remaja menghasilkan kadar protektif. Respons imun remaja pertengahan dan akhir tidak berbeda, namun remaja pertengahan tampak lebih responsif.

DAFTAR PUSTAKA

- Centers for Disease Control and Prevention. *Update: Influenza Activity-United States, September 28, 2008–April 4, 2009, and Composition of the 2009-10 Influenza Vaccine*. Morbidity and Mortality Weekly Report. 2009; 58(14): 369–374.
- Mari K and Blum R. *International Adolescent Health*. In: Fisher M (Ed). Textbook of Adolescent Health Care edisi 1. New York: American Academy of Pediatrics; 2011; p. 17–21.
- Jaspan HE, Lawn SD, Safrit JT, and Bekker L. *The Maturing Immune System: Implications for Development and Testing H1N1 Vaccines for Children and Adolescents*. AIDS. 2006; 20(4): 483–494.
- Radzik M, Sherer S, and Neinstein L. *Psychosocial Development in Normal Adolescents*. In: Neinstein LS (Ed). Adolescent Health Care 5th edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkin; 2008; p. 27-31.
- Chng WJ, Tan GB, and Kuperan P. *Establishment of Adult Peripheral Blood Lymphocyte Subset Reference Range For an Asian Population by Single-Platform Flow Cytometry: Influence of Age, Sex, and Race and Comparison with Other Published Studies*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 2004; 11(1): 168–173.
- Davis MM, King JC, Moag L, Cummings G, and Magder LS. *Countywide School-Based Influenza Immunization: Direct and Indirect Impact on Student Absenteeism*. Pediatrics. 2008; 122(1): e260–265.
- Kim TH, Johnstone J, and Loeb M. *Vaccine Herd Effect*. Scandinavian Journal of Infectious Disease. 2011; 43(9): 683–689.
- Charu V, Viboud C, Simonsen L, et al. *Influenza-Related Mortality Trends in Japanese and American Seniors: Evidence for the Indirect Mortality Benefit of Vaccinating Schoolchildren*. Plos One. 2011; 6(11): e26282.
- Fiore AE, Uyeki TM, Broder K, et al. *Prevention and Control of Influenza with Vaccines Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)*. Morbidity and Mortality Weekly Report. 2010; 59(8): 1-62.
- Wright P, Neumann G, and Kawaoka Y. *Orthomyxoviruses*. In: Knipe D (Ed). Fields Virology 5th edition. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins; 2007; p. 1691–1727.
- Ikatan Dokter Anak Indonesia. *Jadwal Imunisasi Untuk Anak dan Remaja 2008*. (Online). <http://www.idai.or.id/remaja/artikel.asp?q=201176101020>
- Murphy K, Travers P, and Walport M. *Antigen Recognition by B-Cell and T-Cell Receptors*. In: Taylor & Francis. Janeway's Immunobiology 7th edition. New York: Garland Science; 2008; p. 111–142.
- Bridges CB, Katz JM, Levandowski R, and Cox NJ. *Inactivated Influenza Vaccines*. In: Plotkin SA (Ed). Vaccines 5th edition. Philadelphia: WB Saunders; 2008; p. 259–290.
- Barr IG, McCauley J, Cox N, et al. *Epidemiological, Antigenic and Genetic Characteristics of Seasonal Influenza A(H1N1), A(H3N2) and B Influenza Viruses: Basis for the WHO Recommendation on the Composition of Influenza Vaccines for Use in the 2009–2010 Northern Hemisphere Season*. Vaccine. 2010; 28(5): 1156–1167.

15. Taubenberger JK. *The Origin and Virulence of the 1918 'Spanish' Influenza Virus*. Proceedings of the American Philosophical Society. 2006; 150(1): 86-112.
16. Haaheim LR. *Basic Influenza Virology and Immunology*. In: Van-Tam J (Ed). Introduction to Pandemic Influenza 1st edition. Cambridge: Cambridge University Press; 2010; p. 14–26.
17. Englund JA, Walter EB, Fairchok MP, Monto AS, and Neuzil KM. *A Comparison of 2 Influenza Vaccine Schedules in 6-to 23-Month-Old Children*. Pediatrics. 2005; 115(4): 1039–1047.
18. Food and Drug Administration. *Guidance for Industry, Toxicity Grading Scale For Healthy Adult and Adolescent Volunteers Enrolled in Preventive Vaccine Trial*. (Online) 2005. <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Vaccines/ucm074775.htm>
19. Jonathan DK, Ramadhan M, Frederick KO, and Patrick ED. *Human Resistance to Plasmodium Falciparum Increases During Puberty and is Predicted by Dehydroepiandrosterone Sulfate Levels*infection and Immunity. 2001; 69(1): 123–128.
20. Chen MI, Lee VJ, Lim WY, *et al*. *2009 Influenza A(H1N1) Seroconversion Rates and Risk Factors Among Distinct Adult Cohorts in Singapore*. The Journal of American Medical Association. 2010; 303(14): 1383–1391.