

Caracterización antigénica y molecular de cepas inusuales de influenza A detectadas en Cuba durante dos temporadas sucesivas (1984-1985 y 1985-1986)

Antigenic and molecular characterization of unusual strains of influenza A detected in Cuba during two consecutive seasons (1984-1985 and 1985-1986)

Suset Oropesa Fernández,¹ Ángel Goyenechea Hernández,¹ Lourdes Sánchez Álvarez,¹ Clara Savón Valdés,¹ Odalys Valdés Ramírez,¹ Mayra Muné Jiménez,¹ Amely Arencibia García,¹ Grehete González Muñoz,¹ Bárbara Espinosa Hernández,¹ Guelsys González Báez,¹ Rosmery Roque Arrieta¹

¹ Laboratorio Nacional de Referencia de Influenza y otros Virus Respiratorios. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK). La Habana, Cuba.

¹ Centro de Higiene, Epidemiología y Microbiología. Villa Clara, Cuba.

RESUMEN

Introducción: los cambios genéticos frecuentes en los virus influenza tipo A y B, que afectan los sitios antigénicos de las glicoproteínas de superficie (hemaglutinina y neuraminidasa) constituyen la base de las epidemias y pandemias de influenza, caracterizadas por elevadas cifras de morbilidad y mortalidad.

Objetivo: caracterizar antigénica y molecularmente en tipo y subtipo 10 cepas de influenza tipo A aisladas en Cuba durante dos temporadas sucesivas (1984-1985 y 1985-1986).

Métodos: se emplearon las técnicas de inhibición de la hemaglutinación y un ensayo molecular de reverso transcripción-reacción en cadena de la polimerasa anidada.

Resultados: se confirmó por ambas técnicas, la caracterización de las cepas de influenza dentro del subtipo A(H3N2). Todas fueron similares a la cepa pandémica A/Hong Kong/1/68.

Conclusión: se demuestra que las 10 cepas de influenza que circularon en Cuba durante las temporadas de 1984-85 y 1985-86, tenían una estructura antigénica similar a la cepa pandémica A/Hong Kong/1/68(H3N2).

Palabras clave: virus influenza; inhibición de la hemaglutinación; reacción en cadena de la polimerasa.

ABSTRACT

Introduction: genetic changes which frequently occur in influenza viruses A and B and affect the antigenic sites of surface glycoproteins (hemagglutinin and neuraminidase) lie at the base of influenza epidemics and pandemics, characterized by high morbidity and mortality rates.

Objective: carry out an antigenic and molecular characterization into type and subtype of 10 strains of influenza type A isolated in Cuba during two consecutive seasons (1984-1985 and 1985-1986).

Methods: use was made of hemagglutination inhibition techniques and a reverse transcription nested polymerase chain reaction molecular assay.

Results: characterization of the study influenza strains as subtype A(H3N2) was confirmed by both techniques. All were similar to pandemic strain A/Hong Kong/1/68.

Conclusion: the ten influenza strains circulating in Cuba during the seasons 1984-85 and 1985-86 were found to have an antigenic structure similar to that of pandemic strain A/Hong Kong/1/68 (H3N2).

Keywords: influenza virus; hemagglutination inhibition; polymerase chain reaction.

INTRODUCCIÓN

Los virus influenza se consideran uno de los agentes causales más comunes de infección respiratoria entre los humanos. Estos virus son responsables de una importante morbilidad y alrededor de 500 000 muertes anuales en el mundo.¹

En Cuba, por ser un país tropical, la infección por los virus de la influenza se comporta como una enfermedad endémica que cursa con un comportamiento cíclico de brotes epidémicos anuales y casos esporádicos durante todo el año. Esta infección se registra asociada con la neumonía y constituye, en la actualidad, la cuarta causa de muerte en todas las edades. Durante la década del 80 se notifica un total de 3 777 defunciones,² cifra que asciende en el año 2014 a 6 280 fallecidos, con tasas de 38,6 y 56,3 por 100 000 habitantes, respectivamente.³

La hemaglutinina (HA), una glicoproteína superficial y componente antigénico principal de los virus influenza, es en la que se localizan los principales sitios antigénicos, designados como A, B, C, D y E para el subtipo A(H3N2). Las mutaciones que afectan estas regiones en los virus influenza A, especialmente la HA puede inducir la evasión de la respuesta inmunológica mediante la remodelación de los epítopos antigénicos, base para la frecuente reevaluación de las cepas estacionales, aquellas cuya circulación se preve predominante, para su inclusión en las vacunas de influenza⁴ y junto a las cuales pueden cocircular otras cepas sin llegar a diseminarse en toda la población.

La circulación de estas cepas, antigénicamente diferentes a las vacunales de la temporada, pueden generar brotes epidémicos severos de gran importancia epidemiológica, por encontrar bajos niveles de inmunidad en la población, situación que desorienta al sistema de salud, si no se diagnostica oportunamente el agente causal.

Este conocimiento alerta sobre la importancia de mantener una vigilancia activa de los virus influenza para la detección temprana de estos virus, que permita orientar el control y las acciones sobre la influenza en situaciones similares en el momento actual.

La pandemia de 1968 (en Hong Kong), introduce en los humanos un nuevo virus, el A(H3N2), producto del reordenamiento genético entre los virus humanos circulantes con anterioridad y los virus aviáres, asociada con cambios en la HA del subtipo circulante, sin cambios en la neuraminidasa (NA). La pandemia de Hong Kong ocasiona alrededor de 1-4 millones de muertes en el mundo.⁵ Este subtipo desde su emergencia circula hasta el momento actual.

El análisis para la caracterización antigénica en tipo y subtipo, se realiza de manera tradicional por la técnica de inhibición de la hemaglutinación (IH),⁶ que permite la identificación de las cepas circulantes o el reconocimiento de virus emergentes capaces de provocar nuevas epidemias o pandemias, con diferentes grados de severidad en el ámbito mundial.

Desde la década del 80, la introducción de los métodos moleculares permite el diagnóstico de los virus influenza, por ser más rápidos y sensibles para su identificación en tipo y subtipo.⁷ La implementación y realización de estos aporta conocimientos complementarios a la identificación antigénica y brinda una visión más amplia de las características de los virus de influenza circulantes.

El objetivo de este trabajo es caracterizar antigénica y molecularmente en tipo y subtipo 10 cepas de influenza tipo A aisladas durante dos temporadas sucesivas (1984-1985 y 1985-1986).

MÉTODOS

DISEÑO GENERAL

Se realizó un estudio retrospectivo de las características antigénicas y moleculares de 10 cepas de influenza aisladas en dos temporadas sucesivas (1984-1985 y 1985-1986), que se conservaron a -70 °C en el Banco de Cepas del Laboratorio Nacional de Referencia de Influenza, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri".

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS CEPAS OBJETO DE ESTUDIO

Algunas de las principales características de las cepas de influenza objeto de estudio se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Características generales de las cepas seleccionadas, temporadas 1984-85 y 1985-86

Año	Mes	Cepa A(H3)	Edad	Sexo	Brote epidémico	Esporádica	Procedencia
1984-85	Noviembre	2594	20	F	Centro Centinela /Escuela S. Allende		La Habana
1984-85	Noviembre	2600	23	M	Centro Centinela /Escuela S. Allende		La Habana
1984-85	Noviembre	2601	25	F	Centro Centinela /Escuela S. Allende		La Habana
1984-85	Diciembre	2902	41	M		x	La Habana
1985-86	Marzo	820	13	F	Centro Centinela/ /Escuela-ESBEC G. Arocha		Güines (Mayabeque)
1985-86	Marzo	831	13	F	Centro Centinela/ /Escuela-ESBEC G. Arocha		Güines (Mayabeque)
1985-86	Abril	929	12	F	Brote en comunidad		Cienfuegos (Palmira)
1985-86	Abril	932	42	F	Brote en comunidad		Cienfuegos (Palmira)
1985-86	Octubre	2436	50	F	Brote en comunidad		La Habana (Marianao)
1985-86	Octubre	2437	5 M	M	Hospitalizado/ Pediátrico J. M. Marquez		La Habana (Marianao)

Registro: Laboratorio Nacional de Referencia de Influenza, IPK. Cuba.

CEPAS CUBANAS A(H3N2) Y SUEROS HIPERINMUNES HOMÓLOGOS

Las cepas cubanas utilizadas incluyeron a la A/Habana/1040/72, A/Habana/2594/84, A/Habana/2600/84, A/Habana/2601/84, A/Habana/2902/84, A/Güines/820 /85, A/Güines/831/85, A/Cienfuegos/929/85, A/Cienfuegos/932/85, A/Habana/2436/85, A/Habana/2437/85. Los sueros hiperinmunes correspondientes a las cepas A/Habana/1040/72, A/Habana/2594/84, A/Güines/ 831/85, A/Habana/ 2437/85, se produjeron en ratas Wistar (nacional/Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología).

CEPAS DE REFERENCIA DEL SUBTIPO A(H3N2) Y SUEROS HIPERINMUNES HOMÓLOGOS

Todas las cepas de referencia y sus sueros hiperinmunes (producidos en hurones) fueron cedidos gentilmente por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC por sus siglas en inglés). Las cepas empleadas fueron la A/Hong Kong/1/68, A/Port Chalmers/1/73, A/Texas/1/77, A/Bangkok/1/79, A/Filipina/02/82. Estas cepas representan la circulación global de las serovariantes del subtipo A(H3N2) incluidas en las vacunas estacionales desde 1974-1975 hasta 1985-1986.

CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS ANTIGÉNICO

Para la caracterización antigénica se utilizó la técnica IH, por micrométodo, de acuerdo con el protocolo descrito por Palmer y otros.⁶

Para determinar la relación existente entre las cepas circulantes estudiadas en estas temporadas y su analogía con las cepas utilizadas, se realizó el análisis de los resultados según el método propuesto por la Organización Mundial de la Salud (OMS).⁸

Interpretación: Este método se fundamentó en la relación directa y proporcional de los títulos de cada cepa, con los sueros patrones y el título homólogo de la cepa patrón o referencia con su suero. Un aislamiento que reaccionó frente a un antisuero de referencia, con un título igual al obtenido en el virus homólogo ± 1 dilución, se consideró que tenía una relación cercana con este virus. Mientras que, un aislamiento que reaccionó frente a un antisuero de referencia con un título igual o mayor a 4 diluciones, se consideró con una diferencia antigénica significativa o poco relacionado con este virus.

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA

La extracción del ácido nucleico total se realizó a partir de 140 μ L de líquido alantoideo de cada una de las 10 cepas en estudio, mediante el estuche comercial QIAamp®Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Alemania), de acuerdo con protocolo descrito por el fabricante. Este proceso se realizó de forma automatizada con el QIAcube™ extractor (QIAGEN, Alemania), según protocolo del productor.

Los cebadores empleados para la para la TR-RCP fueron: PHA1+ (5` GGG GTT AGC AAA AGC AGG RG3`); PHA11- (5` CAW CCR KCI AYC AKI CCW KIC CAI CC3`).

Y para la RCP anidada los siguientes cebadores: H3 SSQ+ (5`GAC ACC ATG CAG TGC CAA 3`); H3 ASEQ- (5`CCC TCC CAA CCA TTT TCT AT 3`).

La transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa, se realizó mediante el estuche comercial OneStep RT-PCR, siguiendo las instrucciones del productor (catálogo 210212, QIAGEN, Alemania) y para la reacción en cadena de la polimerasa anidada se utilizó la enzima Amplitaq DNA polimerasa (catálogo F00759, Applied Biosystem, USA).

Las condiciones de ambos ensayos (TR-RCP y RCP anidada) se desarrollaron según los principios generales del método descrito por *Ruiz-Carrascoso* y otros, 2010.⁷

Se examinaron 10 μ L de cada producto amplificado por corrida electroforética en gel de agarosa (Sigma) al 2 %. La tinción de los geles de corrida se realizó con una solución de bromuro de etidio y las bandas fluorescentes se visualizaron en un equipo transiluminador de luz ultravioleta (LKB, Suiza).

La identificación de los productos amplificados se realizó mediante la comparación de la talla obtenida con un patrón de peso molecular 100 pb, DNA ladder, Promega, EUA.

La visualización de una banda amplificada a una talla esperada de 1 100 pb para el subtipo H3, se interpretó como un resultado positivo.

RESULTADOS

La evaluación de las características antigénicas en tipo y subtipo de las 10 cepas estudiadas por IH frente al panel utilizado, demostró gran similitud entre las cepas de referencia, las cepas cubanas y los sueros hiperinmunes utilizados. En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos con las cepas de referencia y los 10 aislamientos estudiados por ambas técnicas, así como las relaciones antigénicas con las cepas de referencia y sus sueros homólogos, títulos que fluctuaron entre 1:160 y 1:640; para las cepas cubanas fue de 1:320.

Al comparar las cepas objeto de estudio, con el suero hiperinmune A/Hong Kong/1/68, se observó que 7 (70 %) de los 10 aislados (2594/84, 2601/84, 2902/84, 820/85, 929/85, 932/85 y la 2436/85) presentaron un título idéntico con esta cepa de referencia y las otras tres mostraron una diferencia de una dilución menor (1:160) (tabla 2).

Tabla 2. Tipificación de virus influenza aislados en el período 1984-1986, utilizando las técnicas de inhibición de la hemaglutinación y reacción en cadena de la polimerasa

Cepas de referencia Subtipo AH3	Inhibición de la hemaglutinación Sueros hiperinmunes									TR-RCP Cebador AH3 1 100 pb
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
A/Hong Kong/1/68 (H3N2)	320	160	<	<	<	<	320	80	160	+
A/Habana/1040/72 (H3N2)	160	160	<	<	<	<	160	<	<	+
A/Port Chalmer/1/73 (H3N2)	<	<	160	<	<	<	<	<	<	+
A/Texas/1/77 (H3N2)	160	80	160	640	160	<	80	<	80	+
A/Bangkok/1/79(H3N2)	<	<	160	80	320		<	<	<	+
A/Filipina/02/82(H3N2)	<	<	80	80	<	320	<	<	<	+
Aislamientos										
A/Habana/2594/84	320	80	160	<	<	<	320	320	320	+
A/Habana/2600/84	160	320	20	80	<	<	160	160	160	+
A/Habana/2601/84	320	160	160	<	<	<	320	320	320	+
A/Habana/2902/84	320	160	160	<	<	<	320	80	320	+
A/Güines/820/85	320	160	80	<	<	<	160	160	160	+
A/Güines/831/85	160	80	160	<	<	<	160	320	160	+
A/Cienfuegos/929/85	320	160	80	80	<	<	160	80	320	+
A/Cienfuegos/932/85	320	80	80	<	<	<	80	80	160	+
A/Habana/2436/85	320	160	80	<	<	<	160	160	320	+
A/Habana/2437/85	160	160	160	<	<	<	160	160	320	+

< = 1 : 40.

Sueros hiperinmunes: 1. A/Hong Kong/1/68(H3N2); 2. A/Habana/1040/72 (H3N2); 3. A/Port Chalmer/1/ 73 (H3N2); 4. A/Texas/1/77 (H3N2); 5. A/Bangkok/1/79(H3N2); 6. A/Filipina/02/82(H3N2); 7. A/Habana/2594/84 (H3N2); 8. A/Güines/831/85 (H3N2); 9. A/Cienfuegos/932/85 (H3N2).
Registro: Centro Nacional de Influenza, IPK, Cuba.

Frente al suero hiperinmune de la cepa nacional A/Habana/1040/72 (H3N2) (caracterizada con anterioridad como similar a la de referencia A/England/42/72), con un título homólogo de 1:160, se observó que seis cepas (2601/84, 2902/84, 820/85, 929/85, 2436/85 y 2437/85) inhibieron la hemaglutinación en un título igual al referido. Las otras cepas presentaron una dilución por debajo (1:80); similares resultados se observaron con la A/Port Chalmers/1/73(H3N2).

Cuando se confrontaron con las variantes A/Texas/1/77(H3N2) y A/Bangkok/1/79(H3N2), y la A/Filipina /2/82 (H3N2) se observaron diferencias con respecto a sus diluciones; la mayoría presentaron títulos con cuatro o más diluciones de reducción, que reveló, en general, un cuadro de marcada diferencia antigénica entre ellas.

De forma general, siete de las cepas caracterizadas no presentaron grandes diferencias antigénicas entre sí frente a los sueros hiperinmunes nacionales (2594/84, 831/85 y 2437/85), cuyos títulos oscilaron entre 1:160 y 1:320. Las cepas 2902/84, la 929/85, ambas de La Habana, y la 932/85 de la provincia de Cienfuegos, revelaron una mínima diferencia antigénica (1:80) frente al suero hiperinmune 831/85 y la 932/95 presentó este mismo título con el suero 2594/84 (tabla 2).

La TR-RCP indicó que, en su totalidad, las cepas estudiadas tenían una fórmula antigénica correspondiente a los virus de influenza del subtipo A(H3N2). Los resultados obtenidos con la TR-RCP anidada, método que amplificó un segmento de la subunidad HA1, se correspondió con la talla esperada (1 100 pb) de los virus de influenza A(H3N2) para los cebadores informados por *Ruiz-Carrascoso* y otros, 2010⁷ (tabla 2).

DISCUSIÓN

La pandemia producida por un nuevo virus de influenza, denominado como subtipo A(H3N2), aparece en julio de 1968, en la ciudad de Hong Kong. Este virus, el A/Hong Kong/1/68, surge producto del reordenamiento del subtipo A(H2N2), ya circulante con anterioridad y la cepa aviar A/Duck Ukraine/1/63(H3N8), aislada cinco años antes de la aparición de la cepa A/Hong Kong/1/68.⁵

El subtipo AH3N2 aún persiste su circulación y a partir de su aparición se registran en el mundo múltiples variantes antigénicas estacionales, que originan epidemias anuales con diferentes grados de severidad o importancia epidemiológica, variantes que son incluidas en la vacuna antigripal estacional, la medida más eficaz para la prevención y el control de la influenza.⁹

Hace varias décadas, el subtipo A(H3N2), se considera como el virus de influenza predominante en el ámbito mundial, al que se atribuye la mayor mortalidad causada por estos virus, cuando la influenza se asocia con la neumonía.^{10,11}

En enero de 1969 se aíslan en La Habana las primeras cepas de influenza A, tipificadas como A2, variante Hong Kong, clasificación empleada en esa época. Además, se demuestra en los meses siguientes, la circulación del virus pandémico por evidenciarse en la población niveles de anticuerpos anti-HA frente a estas cepas.^{12,13}

Una de las ventajas de la IH es la posibilidad de realizar la caracterización en tipo y subtipo de los virus de influenza, así como el establecimiento de un patrón antigénico con respecto a cepas pertenecientes a la misma temporada o en las sucesivas, así como la detección de cepas reemergentes.⁶

Por otra parte, cada suero hiperinmune demostró un alto grado de especificidad frente a su cepa homóloga o de referencia, que permitió establecer la similitud o diferencia de las cepas estudiadas con la cepa A/Hong Kong/1/68(H3N2) y sus primeras serovariantes (tabla 2), resultados que se correspondieron con los descritos por otros autores.^{14,15}

Los datos de laboratorio y el análisis derivado de la aplicación del método recomendado por la OMS desde 1971, vigente en la actualidad,⁸ constituyen una notificación poco frecuente de cepas de influenza aisladas en tres lugares diferentes

de Cuba que mostraron un patrón antigénico similar con la cepa pandémica A/Hong Kong/1/68 (H3N2), marcador genético del subtipo AH3 y sus primeras serovariantes.

Durante la temporada 1983-1984, alrededor de 1 500 cepas de virus influenza se caracterizan en los Centros Colaboradores de la OMS. El C.D.C. de Atlanta, Georgia, notifica un 18 % de cepas relacionadas con las variantes antigénicas más antiguas, resultado que muestra una correspondencia parcial con los obtenidos en este estudio, en el cual se demostró la relación con la Hong Kong/1/68 y la A/Texas /1/77.¹⁶

En el transcurso de la temporada siguiente, 1984-1985, se caracterizan más de 1 900 cepas de virus influenza por los Centros Colaboradores de Atlanta y Londres. El 68 % corresponde con el subtipo A(H3N2). Esto constituyó un resultado interesante porque el 4 % de estos aislamientos se acercó a la fórmula antigénica de las variantes más antiguas del subtipo A(H3N2), similar a la obtenida en este trabajo.¹⁷

Para responder a las interrogantes que plantean las infecciones emergentes y reemergentes, se necesita comprensión de las interacciones entre los patógenos microbianos y sus hospederos, el impacto del medio ambiente y los factores sociales en estas relaciones. La importancia de comprender estas interacciones entre el hospedero-patógeno y su impacto están subrayadas para los virus influenza, su transmisión a los humanos y la amenaza potencial e impredecible de las pandemias que ellos producen y la reemergencia de cepas que han circulado.¹⁸

Desde otro ángulo, el origen de las cepas de retorno puede explicarse por la posibilidad de que se mantengan en la población infantil de forma subclínica o en reservorios animales desconocidos hasta que por complejos mecanismos genéticos y cambios producidos por la presión inmunológica selectiva del hospedero, se originan nuevas cepas pandémicas o la reemergencia de cepas que ya circularon entre los humanos.^{19,20}

Ante el hecho singular de la circulación de cepas similares a la A/Hong Kong/1/68, investigadores cubanos realizan un estudio serológico en una población infantil menor de 8 años de edad, donde detectan anticuerpos específicos contra la HA de la cepa pandémica y los aislamientos cubanos por IH, que demuestra la circulación de esta en dicha población que por su edad indica un contacto reciente, con esta variante antigénica en Cuba y apoya los resultados obtenidos.²¹

En la literatura revisada se describen resultados similares en México, un área geográfica cercana a Cuba y que forma parte del corredor del Atlántico para aves migratorias (reservorios de virus influenza),²² donde se informa en las temporadas 1980-81²³ y 1983-84²⁴ el aislamiento y la caracterización antigénica de cepas análogas a la A/Hong Kong/1/68, lo que coincidió con este trabajo.

No se puede eludir la ocurrencia de otro hecho relevante, que puede tener asociación con la detección de estas cepas en Cuba y es que, a partir de 1982, en estudios ecológicos sobre la influenza, se registran aislamientos aviares de influenza con fórmula antigénica A(H3N8),²⁵ que constituyen cepas recombinantes naturales del complejo Hong Kong, como la A/Duck/Ukraine/1/63 (H3N8), virus progenitor de la cepa pandémica A/Hong Kong/1/68 que pudo contribuir a mantener esta cepa en circulación hasta su aparición en estos tres sitios de la isla.²⁶

Por otra parte, las técnicas moleculares para la caracterización de los virus influenza marcan una nueva etapa en su vigilancia, debido a la rapidez y especificidad que tienen en la identificación de estos agentes.⁷

En el ámbito internacional, está documentada la tendencia continua e impredecible de los cambios antigénicos y moleculares de la HA de los virus influenza, sobre todo, la correspondiente al subtipo H3, que permite comprender las diferencias entre las variantes producidas en las epidemias anuales, las pandemias, así como, dan a conocer la dirección de la evolución de estos virus, elementos necesarios para un mejor control de la enfermedad en el mundo.

CONCLUSIONES

Se demuestra que las 10 cepas de influenza que circularon en Cuba durante las temporadas de 1984-85 y 1985-86, tienen una estructura antigénica similar a la cepa pandémica A/Hong Kong/1/68(H3N2).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a las Prof. Isabel Martínez Motas, Dr.C. de la Escuela Latinoamericana de Medicina (ELAM), Prof. Dra. Maritza Pupo Antunez, Dr.C. de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana y al Lic. Edgardo Fundora por la excelente revisión y sugerencias sobre el artículo. A los centros colaboradores de la Organización Mundial de la Salud por su cooperación para la realización de esta investigación.

CONFLICTO DE INTERESES

No existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cox NJ, Subbarao K. Global epidemiology of influenza: past and present. *Ann Rev Med.* 2000;51:407-21.
2. Ministerio de Salud Pública de la República de Cuba. Dirección Nacional de Estadísticas de Salud. Anuario estadístico de Salud, 1995. La Habana: Minsap; Abril, 1995.
3. Ministerio de Salud Pública de la República de Cuba. Dirección Nacional de Estadísticas de Salud. Anuario estadístico de Salud, 2014. La Habana: Minsap; Abril, 2014.
4. Blackburne BP, Hay AJ, Goldstein RA. Changing selective pressure during antigenic changes in human influenza H3. *PloS Pathog.* 2008;4:e1000058
5. Kilbourne ED. Influenza Pandemics of the 20th Century. *Emerging Infectious Diseases.* 2006;12(1):9-14.

6. Palmer DF, Dowdle WR, Coleman MT, Schild GC. Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis. Atlanta: Centers for Disease Control; 1975. p. 25-62.
7. Ruiz-Carrascoso G, Casas I, Pozo F, Perez-Gonzalez C, Reina J, Perez-Brena P. Development and implementation of influenza A virus Subtyping and detection of genotypic resistance to neuraminidase inhibitors. *J Med Virol.* 2010;82(5):843-53.
8. WHO. International Influenza Center for the Americas. Antigenic analysis of influenza virus isolates 1970-1971. Memorandum. WHO; 1971 June. p. 1-5.
9. MMWR. Prevention and Control of Influenza with Vaccines: Recommendations of the Advisory Committee for Immunization Practices. ACIP-U.S., 2015-16. Influenza Season. 2015 August 7 [cited 2017 Feb 4];64(30):818-25. Available from: http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2016025_influenza_activitytable.pdf
10. Lui KJ, Kendal AP. Impact of influenza epidemics on mortality in the United States from October 1972 to May 1985. *Am J Public Health.* 1987;77:712-6.
11. CDC. Estimates of Deaths Associated with Seasonal Influenza - United States, 1976-2007. *MMWR.* 2010 Aug 27;59(33):1057-62.
12. Goyenechea Hernández A. Informe de los resultados obtenidos sobre el plan conjunto para el estudio de la pandemia de virus A Hong Kong y otros procesos respiratorios. *Bol Hig Epidem.* 1971 may-dic;9:81-94.
13. Manev D. Estudio de la estructura antigénica y de las marcas genéticas de las cepas de Influenza A2 variante Hong Kong aisladas en La Habana en el año 1969. *Bol Hig Epidem.* 1971 may-dic;9:95-104.
14. Webster RG, Laver WG. Studies on the origin of pandemic influenza: 1: antigenic analysis of A2 influenza viruses isolated before and after the appearance of Hong Kong influenza using antisera to the isolated hemagglutinin subunits. *Virology.* 1972;48:433-44.
15. Underwood PA. Mapping of antigenic changes in the hemagglutinin of Hong Kong influenza H3N2 strains using a large panel of monoclonal antibodies. *J Gen Virol.* 1982;62:153-69.
16. World Health Organization. Influenza in the world. October 1983- September 1984. *WHO Weekly Epidem Rec.* 1985;60(5):29-36.
17. World Health Organization. MMWR. Influenza - United States, 1984-1985 season. *MMWR.* 1985 July 19;34(28):440-4.
18. Fauci AS. Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases: Influenza as a Prototype of the Host-Pathogen Balancing Act. *Cell.* 2006;2:665-70.
19. Lvov DK, Zhdanov VM. Persistencia de los genes en los virus de la gripe en un foco natural. *Log Mod Biol.* 1982;93(3):333-7.
20. Dowdle WR. Influenza Pandemic Periodicity, Virus Recycling, and the Art of Risk Assessment. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(1):34-9.

21. Sánchez Alvarez ML. Estudio de la estructura antigénica de cepas de influenza aisladas durante el periodo 1984-1985. [Trabajo para optar por el título de Especialista de Primer Grado en Microbiología]. La Habana; 1986.
22. Blanco P, Sánchez B, Wiley JW. Recuperación de aves migratorias neárticas de los órdenes Falconiformes y Accipitriformes en Cuba. Poeyana 500. 2015 (enero-junio). p. 19-23.
23. Kuri Morales P, Cravioto Quintana P, Galván Castillo F, Cortés Ramírez M, Ruiz Rodríguez M, Montiel Cervantes MA, et al. Manual para la Vigilancia Epidemiológica de la Influenza. México, DF: Dirección General de Epidemiología, Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE); 2006.
24. Gutiérrez Ortiz B, Rodríguez Pinto M, Martínez Zúñiga R, Lombardo Aburto E, Aguilar Ituarte F. Estado actual de la influenza: Avances en la prevención 1997-1998. Rev Mex Puericultura y Pediatría. 1997;5(26): 70-81.
25. Savón C, Goyenchea A, Yamnikova SS, Lvov DK. Primer Informe del aislamiento de la gripe A en aves silvestres en Cuba. Rev Cubana Hig Epidemiol. 1985;23(3): 148-56.
26. Morens DM, Folkers GK, Fauci AS. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. Nature. 2004;430:242-9.

Recibido: 25 de agosto de 2017.

Aprobado: 13 de marzo de 2018.

Suset Oropesa Fernández. Laboratorio Nacional de Referencia de Influenza y otros Virus Respiratorios. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK). Novia del Mediodía. km 6½. La Lisa. La Habana, Cuba.
Correo electrónico: s.oro@ipk.sld.cu; soro@infomed.sld.cu