

Caracterización antigénica y molecular de los virus influenza A (H3N2) circulantes en Cuba y su relación con las cepas vacunales (1995-98)

Suset Oropesa-Fernández,* Angel Goyenechea-Hernández, Clara Savón-Valdés, Belsy Acosta-Herrera, Alexander Piñón-Ramos, Grehete Gonzalez-Muñoz, Odalys Valdés-Ramírez, Amely Arencibia-García, Mayra Muné-Jimenez, Bárbara Espinosa-Hernández, Guelsys González-Báez

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK). Laboratorio de Referencia Nacional de Influenza. Novia del Mediodía. km 6½. La Lisa. La Habana. Cuba.

email: s.oro@ipk.sld.cu; soro@infomed.sld.cu

Los cambios antigénicos continuos que ocurren en las glicoproteínas de envoltura (hemaglutinina y neuraminidasa) de los virus influenza, se deben a las mutaciones puntuales y a las promovidas por la selección positiva del sistema inmune, que dan origen a las epidemias anuales y reordenamientos de segmentos genómicos, causa de las temidas pandemias. Los intentos para controlar la influenza mediante la vacunación tienen hasta ahora un éxito limitado y son obstaculizados por estos cambios. En Cuba, país subtropical, las infecciones respiratorias agudas constituyen la primera causa de asistencia médica entre las enfermedades infecciosas y la cuarta causa de muerte asociada con la neumonía. La vigilancia para la influenza, en este país, se monitorea por el Laboratorio de Referencia Nacional de Influenza del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Este trabajo tiene el objetivo de caracterizar antigénica y genómicamente a 21 cepas de influenza aisladas durante 1995-96 hasta 1997-98, y conocer su similitud con las de circulación internacional, incluidas en las vacunas antigripales de igual periodo. La caracterización antigénica y genómica se realizó mediante las técnicas de inhibición de la hemaglutinación, la inmunoperoxidasa y un sistema de reverso transcripción-reacción en cadena de la polimerasa, respectivamente. Mediante las tres técnicas, el 100% de los aislamientos pertenecieron al tipo A y subtipo H3N2 y permitió clasificarlos como similares a las cepas de circulación internacional recomendadas en la composición de la vacuna antigripal correspondiente a esas temporadas.

Palabras claves: influenza, vacuna antigripal, caracterización antigénica, caracterización molecular.

Introducción

La Organización Mundial de la Salud (OMS) organiza una red global de vigilancia para el estudio de los virus influenza, apoyada en Centros Internacionales y Nacionales, cuyo objetivo fundamental es la colección, caracterización antigénica y genómica de las cepas de influenza circulantes en cada temporada en el ámbito mundial y hacer una detección temprana de aquellos virus con características epidémicas o pandémicas (1). A partir de estos resultados, se seleccionan las nuevas variantes virales como constituyentes de la vacuna estacional para el control y prevención de la enfermedad (2).

En Cuba, país subtropical, la influenza constituye un problema de la salud pública. Las infecciones respiratorias agudas, son la primera causa dentro de las enfermedades infecciosas y el cuarto lugar entre las diez principales causas de muerte de todas las edades asociada con la neumonía (3).

La designación de los virus influenza en los tipos A, B y C se basa en las características antigénicas de la nucleoproteína y la proteína matriz. Los virus tipo A se dividen en subtipos sobre la base de las dos glicoproteínas de superficie: la hemaglutinina (HA) y la neuroaminidasa (NA). Hasta este momento se identifican 17 HA diferentes y 10 NA (4).

Está documentada la tendencia continua que tiene el virus a una nueva variación antigénica impredecible, que ocurre, sobre todo, en la HA y la NA, en los influenza tipo A, producidas por acumulación de mutaciones puntuales en los genes que codifican para estas proteínas, proceso conocido como desviación o deriva antigénica, que constituye, además, un mecanismo de evasión para la inmunidad humoral existente en el hospedero (5).

Asimismo, estos virus, por intercambio de segmentos genómicos o reasociación, pueden dar origen a la circulación de cepas con grandes diferencias antigénicas, respecto a las anteriores y producir las pandemias, con

* Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador y Profesor Auxiliar. IPK, La Habana, Cuba.

la ocurrencia de altas tasas de morbilidad y mortalidad a escala mundial.

La utilización de diferentes métodos de diagnóstico tradicionales y el desarrollo actual de las técnicas moleculares permiten un estudio integral de los virus influenza durante las epidemias anuales causadas por los tipos A y B.

El primer paso en la caracterización antigénica en tipo y subtipo para detectar posibles cambios en la HA, se realiza mediante la técnica de Inhibición de la hemaglutinación (IH) con sueros policlonales (6).

Además, para la caracterización en tipo y subtipo puede emplearse la técnica de inmunoperoxidasa con anticuerpos monoclonales (IPX) (7) y la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), que utiliza diferentes cebadores para la amplificación de segmentos específicos del genoma viral, sobre todo el correspondiente a la HA (8).

Teniendo en cuenta la importancia de los virus influenza en el mundo, en este trabajo se presenta un estudio transversal retrospectivo para comparar las características antigénicas y moleculares de virus influenza aislados durante tres temporadas de influenza (1995-96, 1996-97, 1997-98) en Cuba, con las cepas vacunales recomendadas por la OMS para esas temporadas.

Materiales y Métodos

Diseño general: Se realizó un estudio de corte transversal retrospectivo para comparar las características antigénicas y moleculares de 21 virus influenza aislados durante tres temporadas (1995 a 1998).

Temporada: En este trabajo se define como una temporada de influenza desde el día primero de septiembre del año en curso, hasta el 31 de agosto del siguiente año.

Virus: Se analizaron 21 cepas de virus de influenza humano aisladas durante tres temporadas (1995-96, 1996-97, 1997-98). Todos los aislamientos pertenecen a la colección del Laboratorio de Nacional de Referencia de Influenza, del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (LNRI/IPK) de La Habana, Cuba.

Cepas de referencia y sueros hiperinmunes homólogos: Las cepas de referencia y los sueros hiperinmunes homólogos empleados se relacionan en la Tabla 1.

Reactivación de las cepas: Al inicio del trabajo se procedió a la descongelación de las 21 cepas objeto de

estudio para la obtención del título infectivo de cada una. La titulación se realizó mediante la inoculación de 200 µL de la DL50 de dichas cepas en la cavidad alantoidea de huevos embrionados de pollo de 9 días. A continuación, los huevos inoculados se incubaron 48 h a 35°C. El título viral se determinó por la técnica de HA (6).

Caracterización y análisis antigénico

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

Para determinar la relación existente entre las cepas circulantes estudiadas en estas temporadas y su analogía con las cepas vacunales de igual periodo recomendadas por la OMS, se realizaron las pruebas de IH con la batería de virus de referencia y antisueros hiperinmunes, que incluyó a los componentes de la vacuna para estas temporadas.

El análisis de los resultados se realizó según el método propuesto por la OMS (9). Este método se basó en la relación directa y proporcional de los títulos de cada cepa, con los sueros patrones y el título homólogo de la cepa patrón con su suero.

Las diferencias entre los títulos hemaglutinantes proporcionaron una medida de similitud o diferencia entre los aislamientos respecto a las cepas de referencia o vacunales. Por ejemplo, un aislamiento que reaccionó con un antisuero de referencia con un título igual al que reaccionó con el virus homólogo ± 1 dilución, se consideró que tenía una relación cercana con este virus.

Caracterización antigénica mediante la técnica de Inmunoperoxidasa (IPX), por micrométodo

Se ejecutó por el método descrito por Ziegler y colaboradores (7). El procedimiento está basado en un cultivo rápido en células MDCK-L y el empleo de anticuerpos monoclonales para la clasificación en tipo y subtipo de los virus influenza.

Se utilizó una mezcla de anticuerpos contra influenza A y otro contra la influenza B y los anticuerpos monoclonales HA1 - 71 y HA2 - 76 para el subtipaje en H1 y H3.

Reacción en cadena de la polimerasa (RCP)

La RCP se desarrolló según los principios generales del método descrito por Cane y Pringle, 1992 (8) y los cebadores empleados fueron:

Código	Posición	Secuencia
I1	7-24	5' ACTATCATTGCTTTGAGC 3' (+)
I2	362-345	5' TAAGGGTAACAGTTGCTG 3' (-)

Resultados

Se observó que las cepas estudiadas se multiplicaron de forma eficiente en el sistema empleado (huevos embrionados), con una oscilación de los títulos infectivos entre 10^{-3} y 10^{-5} , expresado a partir de los títulos hemaglutinantes obtenidos, que oscilaron entre 1:16 y 1:128.

La evaluación de las características antigénicas en tipo y subtipo de las 21 cepas en estudio mostró que todas pertenecieron al subtipo A (H3N2). De ellas, seis pertenecientes a la temporada 1995-1996 eran similares a la cepa representada por la A/Wuhan/359/9588 (H3N2) y 15 referentes a las temporadas 1996-97 y 1997-98 se identificaron con la cepa A/Johannesburg/33/94 (H3N2).

El análisis mostró que la cepa A/Wuhan/359/95 (H3N2) frente a su suero homólogo tuvo un título de 1:640 por IH.

De los seis aislamientos similares a ella, cuatro se identificaron con títulos idénticos y dos con una dilución de diferencia. Todas estas cepas expresaron una gran similitud antigénica con la de referencia.

Por otra parte, los aislamientos restantes (15), se identificaron más con la cepa A/Johannesburg/33/94 (H3N2), la cual frente a su suero homólogo mostró un título de 1:1280 por IH. Entre ellas, los siguientes aislamientos: 186/97, 203/97, 66/98 y 77/98 mostraron una menor reactividad con esta cepa de referencia, diferenciándose los títulos en dos diluciones.

Por IH, los títulos de los aislamientos 15/97 y 56/98 se diferenciaron en una dilución y los restantes presentaron una reactividad idéntica a esta cepa con su suero patrón, todos obtenidos por IH. Estas pequeñas diferencias se consideraron suficientes para pensar en una identidad antigénica con esta cepa de referencia.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1.

En el panel utilizado para la caracterización antigénica por IH, no se evidenció reacción cruzada, ni inespecífica entre los sueros hiperinmunes del subtipo AH3, AH1 y el tipo B frente a las cepas de referencia correspondientes a cada uno de estos antisueros hiperinmunes.

Las cepas de referencia pertenecientes al subtipo A (H1N1) y el tipo B utilizadas en el trabajo, reaccionaron frente a sus sueros homólogos, con títulos entre 1:320 y 1:640 por IH.

Frente a los anticuerpos monoclonales utilizados en la técnica de IPX y con los cebadores utilizados para la RT-RCP reaccionaron de acuerdo con las características de su tipo y subtipo.

En la Figura 1 se presenta un esquema de las cepas aisladas y su relación con el periodo de detección en el país, comparado con la circulación de las cepas de referencia recomendada por la OMS para la vacuna antigripal en estas temporadas.

Respecto a la caracterización obtenida con la técnica de IPX, las cepas reaccionaron con la mezcla A de anticuerpos y con los anticuerpos monoclonales específicos del subtipo A (H3) (HA1-71 y HA2-76), lo que permitió clasificarlas también en correspondencia con su tipo y subtipo, el A (H3N2) (Tabla 1).

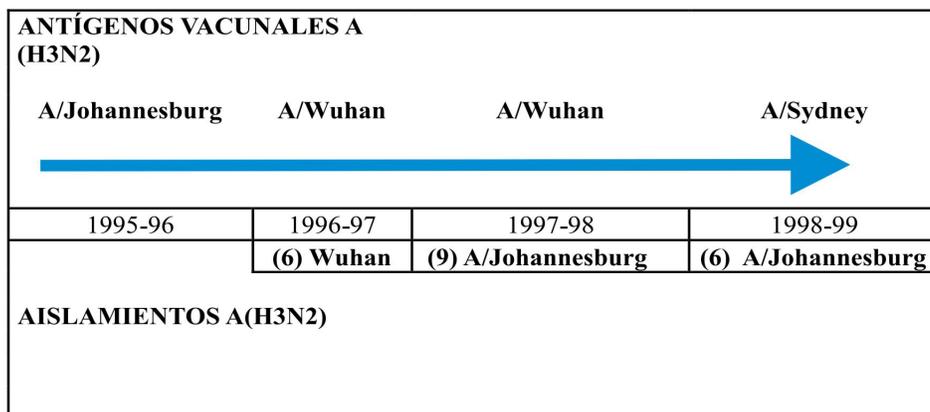


Fig. 1. Representación esquemática de la circulación de las cepas vacúnales empleadas en el periodo del estudio.

Tabla 1. Tipificación de virus influenza aislados, utilizando las técnicas de Inhibición de la Hemaglutinación, Inmunoperoxidasa y reacción en Cadena de la Polimerasa.

Cepas de referencia / Antígenos	Caracterizadas por									
	Inhibición de la Hemaglutinación					Inmunoperoxidasa				RT-PCR
	Sueros Hiperinmunes*					Mezcla	HA2	HA1	Mezcla	Cebador AH3
	1	2	3	4	5	A	-76	-71	B	17 pb
A/H3 (CDC)	320	<	<	<	<	+	+	+	-	+
A/Beijing/32/92 (H3N2)	<	160	<	<	<	+	+	+	-	+
A/Shangdong/ 9/ 93 (H3N2)	<	<	640	<	<	+	+	+	-	+
A/Johannesburg/ 33/ 94(H3N2)	<	<	<	1280	80	+	+	+	-	+
A/Wuhan/ 395/ 95(H3N2)	<	<	<	80	640	+	+	+	-	+
A/Sydney/05/97(H3N2)	<	<	<	80	80	+	+	+	-	+
Aislamientos										
A/Habana/38/96	40	80	80	160	640	+	+	-	-	+
A/Habana/41/96	80	40	40	80	640	+	+	-	-	+
A/Habana/44/96	40	80	80	80	640	+	+	-	-	+
A/Habana/46/96	40	80	40	160	320	+	+	-	-	+
A/Habana/126/96	40	40	80	80	640	+	+	-	-	+
A/Habana/131/96	80	80	40	160	320	+	+	-	-	+
A/Habana/15/97	320	80	640	1280	160	+	+	-	-	+
A/Habana/18/97	160	80	80	640	80	+	+	-	-	+
A/Habana/46/97	80	80	80	1280	160	+	+	-	-	+
A/Habana/48/97	80	80	80	640	40	+	+	-	-	+
A/Habana/182/97	160	160	80	640	80	+	+	-	-	+
A/Habana/186/97	80	160	80	320	40	+	+	-	-	+
A/Santiago de Cuba/193/97	80	40	160	640	80	+	+	-	-	+
A/Santiago de Cuba/195/97	80	40	160	640	80	+	+	-	-	+
A/Santiago de Cuba/203/97	160	40	160	320	40	+	+	-	-	+
A/Habana/3/98	160	80	160	640	80	+	+	-	-	+
A/Habana/56/98	80	80	80	1280	160	+	+	-	-	+
A/Habana/66/98	80	40	80	320	40	+	+	-	-	+
A/Habana/77/98	160	40	40	320	40	+	+	-	-	+
A/Habana/146/98	80	80	80	640	80	+	+	-	-	+
A/Habana/154/98	40	40	160	640	80	+	+	-	-	+
Cepas de referencia Subtipo AH1										
A/H1	640	<	<	<	<	+	+	-	-	-
A/Johanesburg/82/96 (H1N1)	<	320	<	<	<	+	+	-	-	-
A/Taiwan/6/86 (H1N1)	<	<	320	<	<	+	+	-	-	-
A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1)	<	<	<	640	<	+	+	-	-	-
Cepas de referencia Tipo B										
B/Panamá/45/90	320	<	<	<	<	-	-	-	+	-
B/Beijing/184/93	<	640	<	<	<	-	-	-	+	-
B/Guangdong/5/94	<	<	320	<	<	-	-	-	+	-
B/Harbin/7/94	<	<	<	640	<	-	-	-	+	-

* Los antígenos numerados del 1 al 14 se corresponden con su suero homólogo.
 < Título IH menor de 1.20

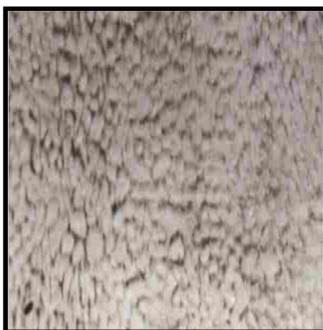
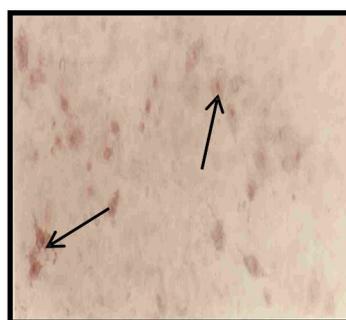
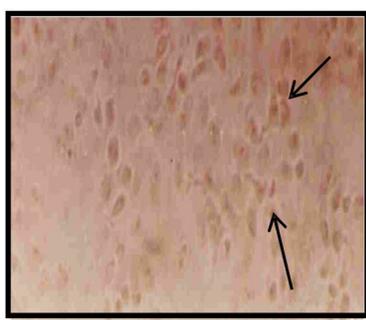


Fig. 2A. Control Negativo.
No se observa ninguna reacción de coloración en las células no infectadas.



Controles Positivos

Fig. 2B. Cepa de referencia.
Se observa coloración roja intracitoplasmática en las células infectadas con virus influenza.

Fig. 2C. Aislamiento 186 /97.

No se detectó coloración en el control negativo establecido, ni reacciones inespecíficas (Figura 2-A). Se observó la coloración intracitoplasmática establecida para el control positivo y todos los aislamientos. Las Figuras 2B y 2C muestran una reacción de IPX positiva con la cepa de referencia y el aislamiento 186/97.

Los resultados obtenidos con la RT-RCP donde se amplificó parcialmente un segmento de la HA1, se correspondieron con la talla (362 pb) de los virus de influenza A (H3N2) visualizados en gel de agarosa al 2%, de acuerdo al patrón de peso molecular utilizado, los resultados se muestran también en la Tabla 1.

Discusión

La influenza es una de las infecciones respiratorias más importantes en los humanos, responsable de 250.000 a 500.000 muertes por año. Además de las afectaciones al sistema de salud, la influenza estacional tiene un costo elevado para la economía de los países afectados, debido al ausentismo laboral y escolar que provoca (10).

En Cuba, el uso de vacunas inactivadas trivalentes contra la influenza en la población de riesgo desde 1997,

se implementa con la finalidad de disminuir los índices de hospitalizaciones por infecciones respiratorias y la mortalidad asociada con la influenza y neumonía.

Desde la pandemia ocurrida por la emergencia del subtipo A (H3N2), predomina la circulación de este virus. Se notifica al tipo A como el más virulento y asociado con la mayoría de las epidemias anuales en las regiones templadas durante el invierno, donde se observan altos índices de morbilidad. Diferentes autores refieren una mayor mortalidad y severidad en los cuadros clínicos cuando comparan los índices obtenidos en temporadas donde predominan los virus A (H1N1) o el tipo B (11).

Como resultado de la vigilancia, los virus influenza se preservan y conservan ex situ: viables, no contaminados y sin variaciones o mutaciones, o sea, en una condición lo más cercana posible al aislamiento original (12), lo que permite su posterior análisis. De manera usual, el análisis antigénico en tipo y subtipo de los virus influenza aislados se realiza mediante la IH, la técnica de referencia internacional o “técnica de oro” y su aplicación permitió la caracterización antigénica de las 21 cepas estudiadas dentro del subtipo A (H3N2) y su similitud con las cepas de referencia (6).

La circulación del subtipo A (H3N2) de influenza, a nivel nacional se hizo evidente también por los niveles de anticuerpos detectados contra la HA, para un 40,2%, 52,0% y un 64,0%, utilizando la IH, en las temporadas referidas.

En el ámbito internacional, la mayoría de los aislamientos caracterizados en estas tres temporadas se relacionan con las cepas vacunales A/Johannesburg/33/94 (H3N2) (13), la A/Wuhan/359/95 (H3N2) (13) y la A/Sydney/5/97(H3N2) (14).

En las tres temporadas investigadas, el subtipo A (H3N2), predomina en el mundo y afecta, sobre todo, a los niños y adultos jóvenes. Este comportamiento coincidió con las observaciones epidemiológicas realizadas en este trabajo. La mayoría de las cepas estudiadas produjeron brotes epidémicos que afectaron también a estos grupos de edades en el país. Inclusive, algunas fueron un agente causal de infecciones respiratorias agudas graves.

Las cepas caracterizadas en este estudio circularon en Cuba durante las temporadas 1995-96, 1996-97 y 1997-98, con una correspondencia antigénica similar a las cepas A/Johannesburg/33/94 y A/Wuhan/359/95 (H3N2), referida por los centros internacionales. Sin embargo, la circulación de la cepa A/Johannesburg/33/94 estuvo desfasada en el país (Fig. 1), la que se detecta en las dos temporadas ulteriores (1997-98 y 1998-99), con respecto a su empleo como antígeno vacunal en la temporada 1995-96 (14, 15).

De forma general, los centros internacionales notifican epidemias producidas por esta cepa entre octubre de 1995 y febrero de 1996, con un incremento en noviembre, en países como Norte América, Estados Unidos de América y Asia (14).

La cepa A/Wuhan/359/95(H3N2), se detectó en meses similares durante 1995-96 y afectó a los grupos de edad ya señalados, con predominio en Francia, Portugal, Inglaterra, Federación Rusa, Canadá, Estados Unidos de América, África y China. Los aislamientos estudiados por centros internacionales durante 1996-97 causaron desde moderadas hasta severas epidemias en estos grupos de edades (16), periodo en que se detectó en Cuba, como puede observarse en la Figura 1.

La actividad de la influenza se describe en los cinco continentes durante la temporada de 1997-98, con aislamientos heterogéneos y representación mayoritaria de las cepas A/Wuhan/359/95 (H3N2) y la A/Sydney/5/97 (H3N2), no identificada en el grupo de aislamientos estudiados en este trabajo (17).

Otros métodos para la identificación del antígeno viral se basan en los ensayos inmunoenzimáticos, mediante la utilización de anticuerpos monoclonales, por el alto grado de especificidad y sensibilidad de los mismos (18).

La aplicación de la técnica de IPX, permitió corroborar la clasificación ya obtenida con la IH. Diferentes autores desarrollan esta técnica como un método de clasificación rápida de los virus de influenza A y B, así como para la identificación en subtipos de los virus dentro del tipo A, aunque requiere la inoculación en cultivos celulares (7). Una de sus ventajas es el empleo de una mínima cantidad de muestra clínica o del aislamiento, independiente de la aparición o no del efecto citopatogénico, con resultados en 24 horas, que elevan el control epidemiológico, la reducción de las operaciones y el tiempo de emisión del resultado, aun cuando se utilizan muestras embebidas en parafina (19).

La técnica de RT-RCP, entre todos los procedimientos de biología molecular, constituye la variante más utilizada para la detección de los virus influenza, su tipificación en A, B y C, así como su diferenciación en subtipos (8, 20).

La RT-RCP permitió amplificar de forma parcial, un segmento de la glicoproteína hemaglutinina (HA1), mediante la utilización de cebadores específicos para el subtipo AH3. En todos los casos estudiados, la longitud del fragmento amplificado fue de 362 pb, talla esperada, para el subtipo A (H3N2) del virus influenza (8).

Al efectuar la comparación entre la técnica de RT-RCP y los métodos clásicos empleados (IH, IPS), se observó coincidencia en todos los resultados lo que podría explicarse por el alto título hemaglutinante obtenido como expresión de la multiplicación en el sistema utilizado (embrión de pollo).

Diferentes autores describen que, con bajos niveles de concentración viral, los resultados pueden diferir. En estos casos, es más ventajosa la RT-RCP por tener una mayor sensibilidad y especificidad, que garantiza la amplificación del ácido nucleico viral a partir de un bajo número de copias del genoma viral (20).

El desarrollo científico y los conocimientos actuales sobre las características antigénicas y genéticas de los virus de influenza se deben al marcado desarrollo de la vigilancia mundial y al estudio de las cepas colectadas y conservadas cada temporada de influenza, por los centros de referencia internacional como objetivo primordial.

La realización de este estudio sobre la caracterización antigénica y molecular de las cepas de influenza circulantes en Cuba resalta la importancia de poder realizar estudios ulteriores de caracterización antigénica y su paralelismo con la secuenciación y filogenia de las proteínas HA y NA, lugar donde ocurren la mayoría de los cambios nucleotídicos y aminoacídicos asociados con la virulencia, la patogenia y la resistencia antiviral, de los virus influenza, información que constituye un elemento estratégico y económico para el desarrollo de las vacunas y el enfrentamiento de las futuras pandemias de influenza.

La mejor arma disponible en la prevención y el control de la influenza, es la vacunación, cuya efectividad depende, en gran medida, de la correlación antigénica entre las cepas circulantes y la composición del preparado vacunal a utilizar. Es importante conocer e identificar qué virus circulan en el mundo durante cada temporada, además de realizar la detección temprana de variantes que afecten a la población, datos que al ser analizados permiten una correcta selección de las cepas de influenza capaces de proporcionar una inmunidad protectora adecuada contra la influenza estacional.

Agradecimientos

Los autores agradecen a las colegas Prof. Dr. C. Isabel Martínez Motas, de la Escuela Latinoamericana de Medicina (ELAM) y Prof. Dr. C. Maritza Pupo Antúnez, 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.

Referencias

1. Taubenberger JK, Morens DM. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerg Infect Dis* 2006;12(1):15-22.
2. Smith DJ. Applications of bioinformatics and computational biology to influenza surveillance and vaccine strain selection. *Vaccine* 2003;21:1758-61.
3. Anuario estadístico de Salud, 2012. Dirección Nacional de Estadística de Salud. La Habana: Ministerio de Salud Pública de la República de Cuba; 2013.
4. Fouchier R, Munster V, Wallensten A, Bestebroer T, Hersfst S, Smith D. Characterization of a Novel Influenza Virus hemagglutinin Subtype (H16) obtained from Black-Headed Gulls. *Journal of Virology* 2005;79(5):2814-22.
5. Strengell M, Ikonen N, Ziegler T, Julkunen I. Minor changes in the hemagglutinin of influenza A (H1N1) 2009 virus alter its antigenic properties. *Plos One* 2011;6:e25848. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22022458>
6. Palmer D, Dowdle W, Coleman M, Schild G. Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis. *Immunology Series No 6. Part. 2: Procedural Guide*, Atlanta: US Department of Health Education and Public Health Service; 1975. p:25-62.
7. Ziegler T, Hall H, Sánchez Fauquier A, Gamble WC, Cox N. Type and subtype specific detection of influenza virus in clinical specimens by rapid culture assay. *J Clin Microbiol* 1995;33:318-21.
8. Cane PA and Pringle CR. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus: rapid identification of subgroup A lineages. *J Virol Methods* 1992;40:297-306.
9. Moattari A, Ashrafi H, Kadivar MR, Kheiri MT, Shahidi M, Arabpour M et al. Antigenic variations of human influenza virus in Shiraz, Iran. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2010;28(2):114-9.
10. Simonsen L. The global impact of influenza on morbidity and mortality. *Vaccine* 1999;17 Suppl 1: S3-10.
11. Ansart S, Pelat C, Boelle PY, Carrat F, Flahault A, Valleron AJ. Mortality burden of the 1918-1919 influenza pandemic in Europe. *Influenza Others Respir Viruses* 2009;3(3):99-106.
12. Smith D. Culture collections over the world. *Int Microbiol* 2003;6:95-100.
13. WHO. WER. Influenza (Flu). *Influenza Summary* 1995;70(8):53-60. Disponible en: <http://www.who.int/wer>
14. WHO. National Advisory Committee on Immunization. Statement on influenza vaccination for the 1996-97 season. *CCDR* 1996;22:89-97. Disponible en: <http://www.who.int/wer>
15. WHO. WER. Influenza (Flu). *Influenza Summary* 1996;71(8):57-64. Disponible en: <http://www.who.int/wer>
16. WHO. WER. Influenza (Flu). *Influenza Summary* 1997;72(7):41-7. Disponible en: <http://www.who.int/wer>
17. WHO. WER. Influenza (Flu). *Influenza Summary* 1998;73(7):41-8. Disponible en: <http://www.who.int/wer>
18. Pulmonary pathologic findings of fatal 2009 pandemic influenza A/H1N1 viral infections. *Arch Pathol Lab Med* 2010;134:235-43.
19. He F, Du Q, Ho Y, Kwang J. Immunohistochemical detection of Influenza virus infection in formalin-fixed tissues with anti-H5 monoclonal antibody recognizing FFWTILKP. *J Virol Methods* 2009;155:25-33.
20. Ruiz-Carrascoso G, Casas I, Pozo F, Pérez-Gonzalez C, Reina J, Perez-Breña P, et al. Development and implementation of influenza A virus subtyping and detection of genotypic resistance to neuraminidase inhibitors. *J Med Virol* 2010;82:843-53.

Antigenic and molecular characterization of influenza A (H3N2) virus strains circulating in Cuba and their relation with vaccine strains (1995-98)

Abstract

The continuous antigenic changes in the influenza viruses occurring primarily on the envelope glycoproteins (hemagglutinin and neuraminidase) are due to specific mutations and to those promoted by the positive selection of the immune system originating the yearly epidemics and the rearrangements of genomic segments, cause of the feared pandemics. The attempts to control the influenza by means of vaccination have so far a limited success and they are obstructed by these changes. The acute respiratory infections are the first cause of medical assistance among the infectious diseases in Cuba, a subtropical country and the fourth cause of death associated with pneumonia. The surveillance for the influenza in this country is monitored by the National Center of Influenza from "Pedro Kouri" Tropical Medicine Institute. The present paper has the objective to characterize 21 strains of influenza isolated from 1995 to 1998 and to know the antigenic and genomic similarity with those of the international circulation included in anti-flu of the same period. The antigenic and genomic characterization was carried out by means of the inhibition techniques of hemagglutination, immunoperoxidase, and a reverse system of transcription-polymerase chain reaction, respectively. Using these three techniques 100% of the isolations were of the type A and the subtype H3N2. It allowed to classify them as similar to the circulating strains of international circulation recommended in the composition of the flu vaccine corresponding to those season.

Keywords: influenza, influenza vaccines, antigenic characterization, molecular characterization.

Recibido: Abril de 2015

Aceptado: Junio de 2015