

## ESTUDIO ANTIGENICO DE CEPAS DE INFLUENZA A (H3N2) CIRCULANTES EN LA ARGENTINA Y SU RELACION CON LAS CEPAS VACUNALES

VILMA L. SAVY, ELSA G. BAUMEISTER, ANDREA V. PONTORIERO

*Servicio Virosis Respiratorias, Departamento Virología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS Carlos G. Malbrán, Buenos Aires*

**Resumen** Debido a que los brotes anuales de influenza en Argentina ocurren comúnmente entre mayo y septiembre, la vacuna producida en el hemisferio norte para ser administrada en el mismo durante los meses de octubre y noviembre podría encontrarse desfasada para nuestro país. Con los fines de determinar si las cepas circulantes en Argentina se encuentran relacionadas cercanamente desde el punto de vista antigénico con las cepas que integran las vacunas administradas, se las comparó con los virus de influenza A(H3N2) aislados entre mayo de 1994 y diciembre de 1997. Los especímenes clínicos (9866) utilizados fueron aspirados nasofaríngeos de niños hospitalizados con infección respiratoria aguda baja e hisopados nasofaríngeos de adultos con síndrome gripal. El diagnóstico de laboratorio inicial fue realizado por inmunofluorescencia, seguido por el intento de aislamiento viral en células MDCK. Se detectaron 242 virus de influenza A que fueron subtipificados antigénicamente por inhibición de la hemaglutinación (IHA) con el equipo de reactivos para influenza distribuido por la OMS. Una fracción de los virus detectados fue analizada antigénicamente por el Centro Colaborador de la OMS, que funciona en el CDC de Atlanta, Estados Unidos. Los virus de Influenza A (H3N2) caracterizados que circularon en Argentina durante los últimos 4 años se correlacionaron parcialmente con los antígenos presentes en las vacunas administradas entre 1994 y 1997. Algunos años, estas variantes antigénicas circularon tardíamente (octubre de 1994 y de 1997). Las mismas iniciaron los brotes epidémicos de los años siguientes, fueron las prevalentes durante los mismos y estuvieron presentes dos años después en la fórmula vacunal administrada en el hemisferio sur. Los resultados de la IHA de nuestros aislamientos mostraron una elevada respuesta específica con los antisueros homólogos y una menos específica (16-64 veces menor) con los antisueros producidos contra las cepas vacunales. Esto nos demuestra la necesidad de intensificar la vigilancia de influenza desde el laboratorio para tratar de formular la vacuna más apropiada.

**Abstract** *Antigenic relationship between influenza A(H3N2) strains circulating in Argentina and vaccine strains.* Influenza epidemic season occurs usually from May to September in Argentina, so that the vaccine produced in the northern hemisphere to be administered during October-November may be out of phase for Argentina. In order to determine if the locally circulating strains in Argentina are antigenically close by related to the vaccine strains administered, they were compared with the influenza viruses isolated from May 1994 to December 1997. Clinical samples (9866) were nasopharyngeal aspirates from children hospitalized for acute lower respiratory tract infection and nasal-pharyngeal swabs from adults with influenza syndrome. Initial laboratory diagnosis was performed by immunofluorescence assay, followed by isolation in MDCK cells. Influenza A viruses (242) were detected and subtyped by hemagglutination inhibition (HAI) with WHO FLU Reagent Kit. A subset of the isolated viruses was antigenically analyzed by the WHO Collaborating Center at CDC, Atlanta, USA. Influenza A (H3N2) viruses characterized as circulating in Argentina during the last four years matched partially with the antigens present in the vaccines administered during 1994-97 period. These antigenic variants sometimes circulate late in the year (October 1994 and 1997) initiating the following influenza season and becoming prevalent. They were present 2 years later in the vaccine formula administered in the southern hemisphere. The HAI results of our isolates show that they are highly specific with the homologous antiserum and much less specific with antibodies against vaccine strains. The difference is 16 to 64 fold different. These results demonstrate the need to intensify influenza laboratory surveillance in order to obtain the best possible vaccine.

**Key words:** influenza, vaccine strains, epidemiology, antigenic variants

La enfermedad respiratoria aguda causada por el virus influenza constituye una de las causas más comu-

nes de morbilidad y mortalidad asociada a infecciones. A menudo puede ser el origen de complicaciones que comprometen la vida del paciente, por ejemplo cuando se trata de ancianos y personas con enfermedades crónicas. Influenza A y B causan un espectro de enfermedad similar, pero los A se asocian más frecuentemente con mayor mortalidad. En contraste, influenza C causa bro-

Recibido: 15-III-1999

Aceptado: 6-IV-1999

**Dirección postal:** Dra. Vilma Savy, Servicio Virosis Respiratorias, INEI-ANLIS Carlos G. Malbrán, Av. Vélez Sarsfield 563, 1281 Buenos Aires, Argentina  
Fax: (54-11)-4301-1035. E-mail: vrmalbra@datamarkats.com.ar

tes localizados e infecciones más leves del tracto respiratorio superior.

Los virus de influenza son virus a RNA de simple cadena negativos, con su genoma fragmentado en ocho porciones. Se clasifican en los tipos A, B y C de acuerdo a las diferencias antigénicas de dos proteínas estructurales, la nucleoproteína (NP) y la proteína matrix (M). Además, los virus de influenza A se dividen en subtipos determinados por las glicoproteínas de superficie hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). La HA es una glicoproteína que se sintetiza como un polipéptido que es posteriormente procesado proteolíticamente para generar dos subunidades, HA1 y HA2 que permanecen unidas por puentes disulfuro. La subunidad HA1 contiene el sitio de unión al receptor celular, como así también la mayoría de los sitios antigénicos de la molécula<sup>1</sup>. Los 15 subtipos de HA (H1-H15) conocidos hasta el momento difieren en un 30% en la secuencia aminoacídica de la HA1, no presentando reactividad cruzada serológicamente; en cambio, la subunidad HA2 es más conservada en todos los subtipos de HA<sup>1,2</sup>. Para la NA se han descrito 9 subtipos (N1-N9)<sup>1,2,3</sup>. Los virus de influenza A de todos los subtipos han sido aislados de aves, mientras que una menor variedad lo ha sido de cerdos, caballos y mamíferos marinos. Del hombre, sólo se han aislado virus con 3 HA (H1, H2 y H3) y 2 NA (N1 y N2), y recientemente una cepa H5 de origen aviar<sup>2,4,5</sup>.

Es conocida la tendencia que tiene el virus a una variación antigénica impredecible que ocurre primordialmente en la HA y la NA, fundamentalmente en los influenza tipo A. Estas variaciones son producidas por acumulación de mutaciones puntuales en los genes que codifican para estas proteínas y que constituyen pequeños cambios. La extensión de los cambios genéticos producidos dará origen a diferencias en los antígenos de superficie, HA y NA. Estas modificaciones determinarán la circulación de cepas más o menos relacionadas antigénicamente en diferentes lugares geográficos durante la misma o en sucesivas temporadas epidémicas.

Además de las epidemias anuales, los virus influenza tipo A tienen la capacidad de provocar infecciones invasivas a escala mundial que comprenden todos los grupos etarios y que se constituyen en pandemias. Los grandes cambios en la estructura antigénica de la HA y NA pueden ocurrir como consecuencia del intercambio de segmentos genéticos (reasociación) entre virus de origen humano, porcino o aviar. La alta tasa de variabilidad, la ocurrencia de reasociaciones o la transmisión directa al hombre de virus animales<sup>5</sup> pueden dar origen, en la población humana, a cepas circulantes con grandes diferencias antigénicas respecto de las anteriores.

La mejor arma disponible en la prevención de las infecciones por influenza es la vacuna. Actualmente se usan en todo el mundo vacunas de influenza inactivadas que necesitan ser adaptadas anualmente para acomodarlas

a los continuos cambios antigénicos. Cada año se corre una carrera contra el tiempo para producir suficientes cantidades de vacuna para las cepas que más probablemente puedan llegar a producir epidemias en la próxima temporada. La selección de dichas cepas se realiza por un comité de expertos mundiales en el tema convocados por la OMS (Organización Mundial de la Salud) que evalúa las características y la circulación global del virus y decide cuáles serán las cepas que pueden actuar más eficazmente en la prevención. La información con que cuenta este comité, proviene de una red mundial de laboratorios colaboradores que detectan las cepas circulantes y sus nuevas variantes en forma rápida y con técnicas confiables.

En el presente trabajo se comparan las características antigénicas de los virus influenza A (H3N2) que fueron detectados en Argentina en el período 1994-97 con las de las cepas incluidas en las vacunas antigripales utilizadas en el mismo período. Estos datos son el resultado de la vigilancia que se realiza en el Centro Nacional de Referencia para la Vigilancia de Influenza del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de la ANLIS Carlos G. Malbrán.

## Materiales y métodos

**Muestras:** Se utilizaron aspirados nasofaríngeos de pacientes menores de 5 años internados con infección respiratoria aguda baja de hasta 10 días de evolución e hisopados nasales y faríngeos de pacientes adultos ambulatorios con síndrome gripal que tenían hasta 4 días de evolución.

Las muestras recolectadas durante todo el período (1994-97) provinieron de la ciudad de Buenos Aires y sus alrededores. A éstas se sumaron las de las ciudades de Ushuaia y Posadas durante 1996 y 97 y las de Neuquén, Santa Fe y La Plata durante 1997.

**Diagnóstico de infección por influenza:** Se realizó la detección de antígenos de influenza A y B en las muestras clínicas por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) con anticuerpos monoclonales específicos de tipo A y B, distribuidos a los Centros Nacionales de Referencia por los laboratorios colaboradores de la OMS, y un anticuerpo antirratón marcado con fluoresceína de origen comercial (DAKO).

**Aislamiento viral:** Se utilizaron monocapas confluentes de células MDCK en microplacas de 24 pocillos. Las mismas se lavaron una vez con medio de mantenimiento (MEM sin suero con el agregado de 1 ml de tripsina 0.25% por cada 100 ml de medio). Se inocularon 200 µl de las muestras previamente tratadas con solución antibiótico-antimicótica (SIGMA Cell Culture Reagents<sup>®</sup>), se dejaron adsorber 30 min a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, agregándose luego 1 ml de medio de mantenimiento para incubar los cultivos en las condiciones descriptas. Se los controló diariamente para observar el desarrollo de efecto citopático (ECP).

Se realizó hemaglutinación (HA) en el líquido sobrenadante con glóbulos rojos de cobayo y de gallo cada 7 días a fin de detectar la presencia de hemaglutininas virales. En los cultivos en que se registró actividad hemaglutinante y/o ECP, se realizó la detección de antígenos virales por IFI sobre las células.

Los cultivos negativos se continuaron durante 14 días, realizándose al 7° día un segundo pasaje. Antes de descartar-

los, se realizó la tinción de IFI en las células del mismo. Los cultivos positivos fueron cosechados, procediéndose a realizar un segundo pasaje en condiciones similares para aumentar el título viral<sup>6</sup>.

**Caracterización antigénica de los aislamientos de influenza A:** La subtipificación inicial de las hemaglutininas de influenza A en H1 y H3 se realizó por la técnica de inhibición de la hemaglutinación (IHA), con el *WHO Influenza Reagent Kit* distribuido por la OMS.

El comportamiento antigénico de los aislamientos en relación con las cepas de referencia, se estudió por IHA con antisueros específicos producidos en hurones, en el Centro Internacional de Referencia para la Vigilancia de Influenza de las Américas ubicado en el Centers for Disease Control and Prevention de Atlanta, EEUU (CDC). Para caracterizar antigénicamente los virus aislados, los títulos de los antisueros de referencia obtenidos con los aislamientos deben ser comparados con los obtenidos con los virus homólogos (de referencia). Un aislamiento que reacciona con un antisuero de referencia con un título igual al que reacciona con el virus homólogo ( $\pm$  una dilución) es considerado relacionado cercanamente a ese virus<sup>7</sup>.

### Resultados

Como resultado de la vigilancia de influenza desde el laboratorio en el período considerado, se estudiaron 9866

TABLA 1.- Infecciones por virus influenza confirmadas por el laboratorio en el período de estudio

Año	N° muestras	Virus detectados		% detec. A + B
		A	B	
1994	1284	18	0	1.4
1995	562	26	4	5.3
1996	1263	55	9	5.1
1997	6757	143	46	2.8
Total	9866	242	59	3.1

TABLA 2.- Títulos IHA de las cepas de virus influenza aisladas y de referencia para el año 1995

Antígenos de referencia y aislamientos	Antisueros de referencia		
	Shang	Joh/33	HK/1
A/Shangdong/09/93(H3N2) Vacunal	<u>640</u>	160	80
A/Hong Kong/01/94 (H3N2)	80	160	<u>1280</u>
A/Johannesburg/33/94 (H3N2)	160	<u>1280</u>	320
AG 4065	160	<u>640</u>	320
AG P11	640	<u>1280</u>	640
AG 4084	160	<u>640</u>	320
AG 4102	640	<u>1280</u>	320
AG 4057	160	160	<u>5120</u>
AG 4098	160	320	<u>2560</u>

Los títulos se expresan como la recíproca de la dilución; el subrayado indica similitud antigénica

muestras clínicas cuya distribución anual y por tipo de virus se muestran en la Tabla 1. Se observó una mayor circulación de virus tipo A en relación con los de tipo B en los cuatro años estudiados.

Para determinar la relación existente entre las cepas circulantes y las de las vacunas disponibles, se realizaron pruebas de IHA usando una batería de virus de referencia y sus antisueros que incluye a aquellos que componían las vacunas recomendadas por la OMS.

TABLA 3.- Títulos IHA de las cepas de virus influenza aisladas y de referencia para el año 1996

Antígenos de referencia y aislamientos	Antisueros de referencia	
	Joh/33	Wuh
A/Johannesburg/33/94(H3N2) Vacunal	<u>640</u>	20
A/Wuhan/359/95(H3N2)	40	<u>640</u>
AG 4573	160	<u>640</u>
AG 10783	40	<u>640</u>
AG 10640	160	<u>1280</u>
AG 10259	20	<u>640</u>
AG 10283	80	<u>640</u>
AG 4535	40	<u>320</u>
AG 4514	320	<u>2560</u>
AG 4459	80	<u>1280</u>
AG 4505	160	<u>640</u>
AG 4502	40	<u>640</u>
AG 32	80	<u>640</u>
AG 37	40	<u>640</u>
AG 52	80	<u>640</u>
AG 60	40	<u>640</u>
AG 67	80	<u>320</u>

Los títulos se expresan como la recíproca de la dilución; el subrayado indica similitud antigénica

TABLA 4.- Títulos IHA de las cepas de virus influenza aisladas y de referencia para el año 1997

Antígenos de referencia y aislamientos	Antisueros de referencia		
	Wuh	N/933	Syd/5
A/Wuhan/359/95(H3N2) Vacunal	<u>640</u>	1280	<u>80</u>
A/Nanchang/933/95(H3N2) Vacunal	320	<u>1280</u>	<u>80</u>
A/Sydney/05/97 (H3N2)	40	40	<u>640</u>
AG 5456	10	10	<u>640</u>
AG 5399	80	80	<u>1280</u>
AG T124	80	80	<u>2560</u>
AG T12089	160	160	<u>1280</u>

Los títulos se expresan como la recíproca de la dilución; el subrayado indica similitud antigénica

TABLA 5.— Cepas de virus influenza aisladas y cepas vacunales utilizadas en el período de estudio

Año	Cepas aisladas <sup>a</sup>	Cepas vacunales
1994	A/Johannesburg/33/94 (H3N2)	A/Beijing/32/92 (H3N2) A/Singapore/06/86 (H1N1) B/Panama/45/90
1995	A/Hong Kong/01/94 (H3N2) A/Johannesburg/33/94 (H3N2) B/Beijing/184/93	A/Shangdong/9/93 (H3N2) A/Singapore/06/86 (H1N1) B/Panama/45/90
1996	A/Wuhan/359/95 (H3N2) A/Texas/36/91 (H1N1)	A/Johannesburg/33/94 (H3N2) A/Singapore/06/86 (H1N1) B/Beijing/184/93
1997	A/Sydney/05/97 (H3N2) A/Bayern/07/96 (H1N1) B/Beijing/184/93	A/Wuhan/359/95 (H3N2) A/Singapore/06/86 (H1N1) B/Beijing/184/93

a: la denominación de las cepas aisladas indica que son similares antigénicamente a la cepa prototipo correspondiente

Estos resultados se muestran en las Tablas 2, 3 y 4 para los años 1995, 1996 y 1997 respectivamente. Las cepas de referencia se denominan con la nomenclatura completa, en tanto que las cepas argentinas llevan el prefijo AG. Se debe tener en cuenta que sólo pueden ser tipificados por IHA los virus cuyo aislamiento fue posible en el laboratorio.

Nuestras cepas reaccionaron con altos títulos con su antisuero homólogo, observándose títulos 16 a 64 veces menores cuando se las enfrenta con el antisuero correspondiente a la cepa vacunal utilizada en el año. Esta diferencia es considerada suficiente para interpretar que el aislamiento se comporta como una variante antigénica respecto de una cepa de referencia. La caracterización final realizada en el CDC de las cepas del año 1994 denominadas AG3715 y AG3779 las mostró como similares a A/Johannesburg/33/94 (H3N2).

En la Tabla 5 se resumen las caracterizaciones antigénicas de las cepas aisladas y las fórmulas de la vacuna antigripal recomendada por la OMS y utilizada en los distintos años.

## Discusión

El uso de vacunas inactivadas trivalentes para influenza en la población de riesgo se ha implementado en nuestro país en los últimos años con la finalidad de disminuir los índices de internaciones hospitalarias por infecciones respiratorias y la mortalidad asociada a influenza. Desde la emergencia de los virus A(H3N2) en 1968, la circulación de este tipo de virus en forma predominante estuvo asociada con índices más altos de morbilidad y mortalidad, sobre todo en los ancianos, si los compara-

mos con los índices obtenidos en temporadas donde predominaron los virus A(H1N1) o B<sup>8</sup>.

En el período abarcado en este trabajo, si comparamos las muestras totales con que se trabajó en los distintos años, vemos que hemos logrado aumentar el número de muestras procesadas y el número de virus influenza recuperados, aunque siguen constituyendo una pequeña proporción del total. Esto se debe a que las muestras son recolectadas a lo largo de todo el año, período durante el que se producen brotes de otros virus respiratorios, sobre todo teniendo en cuenta la gran proporción de muestras provenientes de la población infantil. La circulación del virus influenza se acota a uno o dos brotes epidémicos en el año, de corta duración, y es en ese momento donde se detecta la mayoría de los virus. Por ejemplo, la detección de influenza A en el pico del mes de octubre de 1997 constituyó desde un 5 hasta un 25% del total de los casos remitidos a los distintos laboratorios colaboradores (dato no mostrado). Estos datos no deberán interpretarse como un aumento en el número de casos de infección respiratoria sino como un aumento en la incorporación de médicos y laboratorios colaboradores con la red de vigilancia.

La detección de cepas A(H3) fue predominante en todo el período. No se detectaron cepas A(H1) en 1994 y 1995, dato concordante con los de otros laboratorios<sup>9,10</sup>. Se realizó un solo aislamiento A(H1) en 1996 proveniente de Ushuaia, co-circulando luego ambos subtipos en 1997, en un brote epidémico ocurrido en octubre de ese año<sup>9,11,12</sup>.

En el esquema que se presenta en la Figura 1, puede observarse el desfase existente entre los virus A(H3N2) circulantes y el correspondiente antígeno vacunal empleado en el país con un retraso de hasta 2 temporadas.

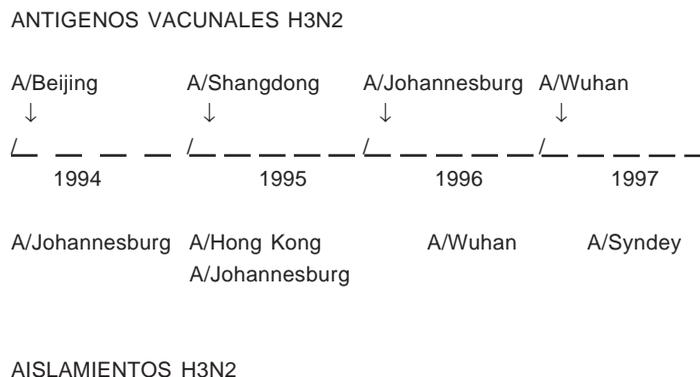


Fig. 1.— Representación esquemática de la circulación de las cepas A(H3N2) en relación a las cepas vacunales empleadas en el período del estudio

Este tipo de situaciones ya había sido observado con anterioridad para Argentina<sup>13</sup> y analizado en un trabajo donde se incluyen otros países de Latinoamérica y el Caribe<sup>14</sup>.

Como la efectividad de una vacuna depende, en parte, de la correlación antigénica entre las cepas circulantes y el componente vacunal, la misma puede estar disminuida cuando se usan cepas antigénicamente distinguibles y que constituyen variantes, proporcionando una protección relativa contra la enfermedad ocasionada por dicha variante<sup>15</sup>. De esto surge la importancia de conocer qué virus circula en el país y la detección temprana de las variantes que se originen mediante una red nacional de laboratorios colaboradores que realicen vigilancia epidemiológica de influenza, para detectar los virus que afectan a la población.

Los datos obtenidos en los países son analizados en una reunión que se realiza en febrero de cada año durante la cual la OMS hace la recomendación para la composición de la vacuna que se comenzará a utilizar al cabo de 6 meses, tiempo requerido por los fabricantes para su preparación. Este cronograma de trabajo hace que la vacuna actualizada no esté accesible para su uso en el hemisferio sur antes del comienzo de la temporada epidémica, generalmente en mayo o junio. Esta situación se ve agravada por los siguientes factores: en primer lugar, el número de cepas con que los países de Latinoamérica contribuyen a la vigilancia mundial es escaso, elemento que, al evaluar la circulación mundial del virus, hace que sus datos tengan poco peso en el contexto global; y, en segundo término, la observación de que la circulación de cepas es diferente en ambos hemisferios. Así, en 1994 la cepa A/Johannesburgo/33/94 fue detectada por primera vez hacia fines del invierno en Sudáfrica y en el mes de octubre en Buenos Aires. En 1997, la cepa A/Sydney/05/97 lo fue en junio en Nueva

Zelanda y Australia y se expandió primero en el hemisferio sur. En Argentina, en 1997, la cepa A/Sydney reemplazó totalmente a la anterior A/Wuhan/359/95, evento que no sucedió en Estados Unidos, por ejemplo, donde co-circularon ambas cepas en la temporada 97-98 lo que determinó un llamado de atención para los laboratorios de salud pública de ese país y colaboradores de la OMS para disponer tempranamente de los virus y las caracterizaciones correspondientes<sup>15</sup>.

El análisis del trabajo de Regnery et al.<sup>14</sup> muestra que la circulación viral difiere entre los países latinoamericanos y que, en general, hubo más temporadas en Norteamérica y Europa donde los virus hallados y las cepas vacunales tuvieron buena concordancia en comparación con lo sucedido en Latinoamérica. De este grupo de países, el nuestro fue uno de los más afectados.

Debido a estos hallazgos, durante la reunión de selección de cepas vacunales de febrero de 1998 se decidió realizar una revisión de los datos disponibles a nivel mundial a fin de actualizar la fórmula vacunal a ser utilizada en el hemisferio sur, reunión que tuvo lugar en el mes de septiembre de ese año.

La necesidad de mejorar y extender la vigilancia de influenza a todo el país, así como de aumentar el número de virus estudiados, implica la incorporación de médicos centinela que detecten los casos clínicos y tomen las muestras correspondientes y la implementación de una red de laboratorios de diagnóstico virológico que envíen los virus detectados en tiempo y adecuadamente a los Centros de Referencia Nacionales para su estudio.

**Agradecimientos:** A los Dres. AM Borsa, MC Mallimaci, F. Payés Monzón, L. Pianciola, MJ Rial y M Sequeira por el envío de muestras. A las Sras AM Campos y M Garín por la asistencia técnica.

## Bibliografía

1. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka: Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 1992; 56: 152-79.
2. Subbarao K, Klimov A, Katz J, et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* 1998; 279: 393-6.
3. Cox NJ and Bender CA. The molecular epidemiology of influenza viruses. En: *Seminars in Virology* 1995; 6: 359-70.
4. Class ECJ, Osterhaus ADME, van Beek R, et al. Human influenza A(H5N1) virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* 1998, 351: 472-7.
5. Scholtissek C, Rohde W, von Hoyningen V, Rott R. On the origin of the human virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology* 1978; 87: 13-20.
6. Kendal AP, Pereira MS, Skehel JJ. Viral isolation. En *Concepts and procedures for laboratory based influenza surveillance*. Centers for Disease Control y Organización Sanitaria Panamericana; 1982; p. B7-B16.
7. Kendal AP, Pereira MS, Skehel JJ. Hemagglutination inhibition. En: *Concepts and procedures for laboratory based influenza surveillance*. Centers for Disease Control y Organización Sanitaria Panamericana; 1982; p B17-B35.
8. Simonsen L, Clarke MA, Williamson GD, Stroup DF, Arden NH, Schonberger LB. The impact of influenza epidemics on mortality: introducing a severity index. *Am J Public Health* 1997, 87: 1944-50.
9. Uez O, Fernández Pascua C, Gutiérrez ML, Famproyen G, Racca D, Sabando P. Virus respiratorios en pediatría. Vigilancia epidemiológica intensificada, 1997. Mar del Plata, Argentina. Libro de Resúmenes, XI Congreso Latinoamericano de Pediatría, Santiago, Chile, 1998.
10. Sequeira MD, Zerbini E, Imaz MS, et al. Etiología de las infecciones agudas del tracto respiratorio inferior en niños menores de cinco años en Santa Fe. *Medicina (Buenos Aires)* 1997; 57: 191-9.
11. Savy V, Baumeister E, Campos A. *Boletín GROG (Grupo colaborativo de Vigilancia Epidemiológica de la gripe en Argentina)* 1997, N° 1.
12. Riva Posse C. Influenza. *Boletín Epidemiológico Nacional, Ministerio de Salud y Acción Social de la República Argentina*. 1996-97; p. 17.
13. Uez O, Knez V, Fernández Pascua C, et al. Influenza virus epidemiological surveillance in Argentina, 1987-1993, with molecular characterization of 1990 and 1993 isolates. *Pan Am J Public Health* 1998; 4: 405-10.
14. Regnery HL, Bender C, Subbarao K, et al. Antigenic and genetic analysis of influenza A(H3N2) strains isolated in Latin American and Caribbean countries since 1991. Presentado como poster en: International Conference on Emerging Infectious Diseases, Atlanta, 1998.
15. *MMWR*, Editorial note. 1998; 47: 37-8.