

Utilidad de la transcripción reversa–reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para la vigilancia proactiva y el diagnóstico clínico del dengue*

Comach G^{1,2}, Alvarez M¹, Camacho D¹, Chiarello A¹, de Quintana M¹, Soler M¹, Sierra G¹, Guzmán D¹, Villalobos F³, Rodríguez-Henríquez F²

Un sistema de vigilancia proactiva efectivo para dengue requiere de técnicas de laboratorio rápidas y confiables que puedan detectar tempranamente la transmisión viral para predecir las epidemias con suficiente anticipación. En este sentido, la técnica de reverso transcripción – reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) es una alternativa que ha sido utilizada exitosamente en sistemas de vigilancia proactiva de Centro y Sur América. En este estudio comparamos las cualidades de diagnóstico confirmatorio temprano del dengue de la técnicas RT-PCR, aislamiento viral en células C6/36 y serotipificación con anticuerpos monoclonales anti-dengue (AIV), ensayo inmunoenzimático de captura de IgM anti-dengue (MAC-ELISA) y la inhibición de la hemaglutinación (IHA). Para el estudio utilizamos 1.019 sueros de pacientes atendidos por el sistema de vigilancia proactiva del estado Aragua, Venezuela. Los resultados demostraron que la RT-PCR tuvo: a) mayores tasas de positividad que el AIV, el MAC-ELISA y la IHA, b) alta sensibilidad (100%) y aceptable especificidad (73,5%) respecto al AIV, y c) buena eficacia y rapidez en obtener resultados en los cuatro días iniciales de la enfermedad. Estas cualidades la convierten en una poderosa herramienta para la vigilancia proactiva del dengue.

Palabras clave: Dengue, Vigilancia Proactiva, Diagnóstico del dengue, RT-PCR, MAC-ELISA.

INTRODUCCIÓN

El dengue, la arbovirosis tropical humana más importante del mundo, es causada por uno de cuatro serotipos antigénicamente relacionados, pero

serológicamente distintos (Den 1, Den 2, Den 3 y Den 4), de un virus del género Flavivirus (Gubler & Clark, 1995; Rigau-Pérez *et al*, 1998; Gubler, 1998). En 1998, hubo un estimado anual de 100 millones de casos de FD, 500.000 de Fiebre Hemorrágica de Dengue (FHD) y 25.000 fallecidos (Gubler, 1998). En Venezuela, desde 1989 hasta 1998, se han producido 176.211 casos (35.837 de FD y 40.374 de FHD) y 413 muertes (Dirección de Vigilancia Epidemiológica, Ministerio de Salud y Asistencia Social, datos inéditos, 1998). Durante todos estos años, el estado Aragua siempre ha sido uno de los más afectados y desde 1994 han circulado intensamente los serotipos Den 1, Den 2 y Den 4 (Anonymous, 1990; Larrea *et al*, 1997; Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, 1998).

El dengue, por ser de rápida transmisión, requiere de una vigilancia epidemiológica proactiva capaz

Investigación financiada por los proyectos PCEE Ven/96/02-LP2129, PCEE CONV-1-97, CDCH-UC 1374-97 y FUNDACITE ARAGUA DLSA-0048.¹Laboratorio Regional de Diagnóstico e Investigación del Dengue y otras Enfermedades Virales (LARDIDEV). Av. Miranda Este, Hospital Civil de Maracay, Entrada Sur (frente al Teatro de la Opera), Maracay 2101, Aragua Venezuela. Telefax: 58-243-232.46.30. Email: lardidev@telcel.net.ve. ²Centro de Investigaciones Biomédicas (BIOMED), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Núcleo Aragua. Final Calle Cecilio Acosta, Urb. La Rinconada, Las Delicias, Maracay 2105, Aragua, Venezuela. ³Servicio de Epidemiología, Hospital Central de Maracay, CORPOSALUD ARAGUA. Final Av José María Vargas c/c Av. Sucre, Maracay 2105, Aragua, Venezuela.

de detectar tempranamente la propagación viral a fin de orientar las medidas de control con antelación al momento de transmisión máxima (Gubler, 1989; Organización Panamericana de la Salud, 1995; Rigau-Pérez *et al*, 1998; Gubler, 1998). Para la detección de la infección por el virus dengue (VD) en la vigilancia proactiva se han recomendado las pruebas serológicas de inhibición de la hemaglutinación (IHA) (Clarke & Casals, 1958; Gubler, 1989; Organización Panamericana de la Salud, 1995; Vorndam & Kuno, 1997; World Health Organization, 1997), el ensayo inmunoenzimático de captura de IgM anti-dengue (MAC-ELISA) (Kuno *et al*, 1987; Gubler, 1989; Organización Panamericana de la Salud, 1995; Vorndam & Kuno, 1997; World Health Organization, 1997), y la técnica virológica del aislamiento y la tipificación serológica del VD (AIV) (Gubler *et al*, 1984; Gubler, 1989; Organización Panamericana de la Salud, 1995; Vorndam & Kuno, 1997; World Health Organization, 1997).

Las técnicas serológicas de IHA y MAC-ELISA, aparte de no haber sido creadas para la detección e identificación del VD, son apropiadas sólo para el análisis de sueros apareados (IHA), o sueros individuales colectados 5 o más días después del inicio de la enfermedad (MAC-ELISA) (Clarke & Casals, 1958; Kuno *et al*, 1987; Gubler, 1989; Organización Panamericana de la Salud, 1995; Vorndam & Kuno, 1997; World Health Organization, 1997). El AIV si permite la detección e identificación específica del VD, sin embargo, su sensibilidad depende mucho de una adecuada recolección y conservación de la muestra, y requiere de 5 a 10 días para dar resultados (Gubler *et al*, 1984; Gubler, 1989; Organización Panamericana de la Salud, 1995; Vorndam & Kuno, 1997; World Health Organization, 1997).

Un avance significativo en el diagnóstico del dengue ha sido la implementación de la técnica Reverso Transcripción-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR), debido a que permite detectar rápidamente, con buena sensibilidad y especificidad, mínimas cantidades de ARN del VD en todo tipo de muestras clínicas (Deubel *et al*, 1990; Lanciotti *et al*, 1992; Chungue *et al*, 1993; Reynes *et al*, 1994; Harris *et al*, 1996; Sudiro *et al*, 1997; Vorndam & Kuno, 1997; Harris *et al*, 1998; Rosario *et al*, 1998; Balmaseda *et al*, 1999), incluyendo las que contienen virus inactivados debido a un almacenaje inapropiado de la muestra, o a la formación de complejos virus- anticuerpos neutralizantes (Rigau-Pérez *et al*, 1998; Vorndam & Kuno, 1997). Uno de los procedimientos más difundidos, el descrito por Lanciotti *et al* (1992), ha sido utilizado exitosamente con ligeras modificaciones en países de Centro y Sur América y del Caribe (Harris *et al*,

1996; Harris *et al*, 1998; Rosario *et al*, 1998; Balmaseda *et al*, 1999). En Nicaragua, por ejemplo, desde 1995 ha sido empleado en la vigilancia proactiva del dengue en un número seleccionado de casos y adaptada a un solo paso a fin de reducir el tiempo de su ejecución (Harris *et al*, 1996; Harris *et al*, 1998; Balmaseda *et al*, 1999).

En el presente estudio realizamos una evaluación exhaustiva de la eficacia de la técnica RT-PCR descrita por Lanciotti *et al* (1992), en comparación con las técnicas de AIV, MAC-ELISA e IHA, para la detección temprana de la infección activa por VD, utilizando muestras de suero de pacientes sospechosos de dengue que son captados mayormente por el sistema de vigilancia proactiva del estado Aragua. Nuestra meta es incorporarla definitivamente al programa regional de control y prevención del dengue para obtener información rápida y precisa sobre la actividad del VD en tiempo, espacio y serotipos circulantes, sobre todo de los asociados con las formas severas de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de pacientes

Se evaluaron 1.019 pacientes sospechosos de dengue, captados entre Octubre de 1997 y Diciembre de 1999 por el sistema de vigilancia epidemiológica proactiva del estado Aragua y otros centros de salud públicos y privados de éste y otros estados. Las muestras de los pacientes (sueros sanguíneos colectados in vivos en los primeros 5 días de inicio de la enfermedad [DIE], así como tejidos de órganos en fallecidos) fueron procesadas en el Laboratorio Regional de Diagnóstico e Investigación del Dengue y otras Enfermedades Virales (LARDIDEV). Cada muestra estaba acompañada de un cuestionario (ficha de paciente) con información clínico-epidemiológica del caso.

Extracción de ARN viral y RT-PCR para la tipificación del vd.

La extracción del ARN viral se realizó utilizando el kit RNAgents (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. La extracción de ARN viral de las muestras de tejidos de autopsia (hígado, bazo, pulmón, corazón) se realizó en forma similar al suero, excepto que previamente se digirieron las proteínas contaminantes del tejido mediante una modificación del método de lisis celular con proteinasa K (Delidow *et al*, 1993). La RT-PCR se realizó mediante el procedimiento descrito por Lanciotti *et al* (1992) utilizando el kit de Access RT-PCR (Promega), con modificaciones en los tiempos de los ciclos recomendados por el fabricante. Los ADNc amplificados del VD (amplicones) fueron analizados

mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (100V, 60 min), seguido de tinción con bromuro de etidio y visualización con luz ultravioleta (UV). La identificación del serotipo del VD se realizó de acuerdo a la talla de la banda de cada amplicón relativa a la correspondiente del marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder, Promega). La preparación de las muestras (extracción de ARN) y la amplificación de los ADNc, se realizaron en áreas físicas diferentes utilizando pipetas esterilizadas separadas y puntas antiaerosoles para evitar contaminaciones cruzadas. En cada análisis, se incluyeron como controles negativos sueros de personas sanas y, como controles positivos sueros de pacientes con diagnóstico previo por AIV y virus Den-1, Den-2, Den-3 y Den-4 aislados en células C6/36 (Gubler *et al*, 1984). Los virus Den-1, Den-2, y Den-4 fueron aislados autóctonos realizados en el LARDIDEV, y el de Den-3, procedente de Aruba, fue gentilmente donado por el Dr. Ferdinando Liprandi del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

Aislamiento viral y serotipificación específica con anticuerpos fluorescentes policlonales y monoclonales anti-dengue (AIV).

El aislamiento del virus dengue (VD) se realizó en la línea celular C6/36 (Clon HT) y la serotipificación específica mediante las técnicas de inmunofluorescencia directa (IFD) e indirecta (IFI), con anticuerpos policlonales y monoclonales anti-dengue (Gubler *et al*, 1984).

Inhibición de la Hemaglutinación (IHA)

La prueba inmunoserológica de inhibición de la hemaglutinación (IHA) fue realizada según el procedimiento descrito por Clarke & Casals (1958). En muestras únicas, se consideraron como positivos todos los sueros que presentaron títulos recíprocos de IHA $\geq 1:2560$; según los criterios de reconocidos expertos (Gubler, 1989; Organización Panamericana de la Salud, 1995; Vorndam & Kuno, 1997; World Health Organization, 1997). Todos estos positivos se consideraron como casos de infección secundaria.

Ensayo inmunoenzimático de captura para IgM anti-dengue (MAC-ELISA)

La técnica MAC-ELISA se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Kuno *et al* (1987), con modificaciones introducidas en el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (1995) y en el LARDIDEV (datos inéditos).

Métodos de análisis estadísticos e interpretación

Cuando fueron necesarios, los análisis estadísticos de Odds Ratio (OR), límites de confianza al 95% (LC95%) y valores de Chi-cuadrado (χ^2) de Mantel-Haenszel y de probabilidad (p) a un nivel de confianza a de 0,05, fueron automatizados con el programa (software) EpiInfo, versión 6.04b (USD, Incorporated, Stone Mountain, Georgia).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las tasas de positividad de cada una de las técnicas utilizadas fueron de 35,6% (363 de 1.019) para la RT-PCR; 32,6% (332 de 1.019) para el MAC-ELISA, 24,4% (249 de 1.019) para la IHA y 12,5% (127 de 1.019) para el AIV. Los resultados de nuestro estudio demuestran que en condiciones rutinarias de vigilancia proactiva, la RT-PCR detecta más casos positivos de dengue que el AIV, o las pruebas serológicas convencionales. Con respecto al AIV, Reynes *et al* (1994) y Balmaseda *et al* (1999), también en condiciones de campo, pero utilizando métodos diferentes de RT-PCR, reportaron resultados muy similares a los nuestros. La superioridad de la RT-PCR sobre el MAC-ELISA era de esperarse debido a la conocida limitada sensibilidad de esta última en las fases iniciales de la enfermedad (Gubler, 1989; Organización Panamericana de la Salud, 1995; Vorndam & Kuno, 1997; World Health Organization, 1997, Gubler, 1998). La supremacía de la RT-PCR sobre la IHA, aunque estuvo restringida a la detección de casos probables de infecciones secundarias (ver materiales y métodos), es remarcable en vista de la alta sensibilidad atribuida a la prueba IHA para el diagnóstico de este tipo de infecciones (Clarke & Casals, 1958; Gubler, 1989; Organización Panamericana de la Salud, 1995; Vorndam & Kuno, 1997; World Health Organization, 1997).

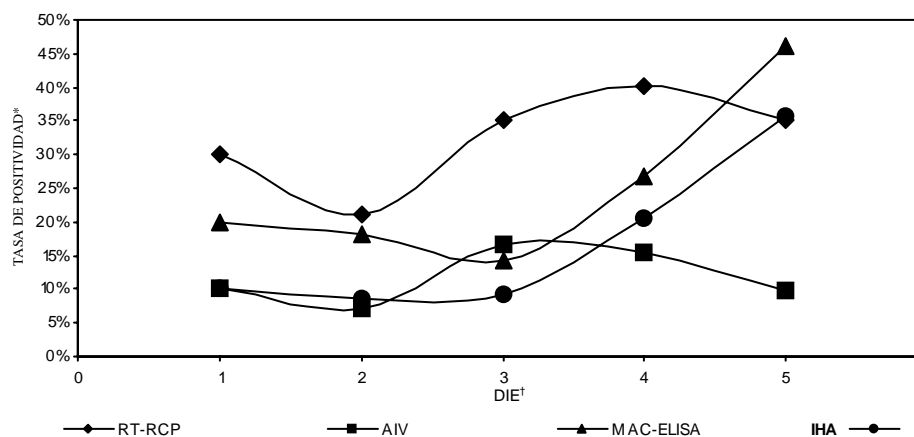
Utilizando el AIV como prueba de referencia, la RT-PCR demostró tener una sensibilidad de 100%, especificidad de 73,5%, coincidencia de 76,8%, valor predictivo positivo de 35% y valor predictivo negativo de 100%. Todos los serotipos (Den 1; Den 2 y Den 4) identificados por el AIV, también lo fueron por la RT-PCR (100% de sensibilidad y especificidad). El índice de sensibilidad de la RT-PCR obtenido en nuestro estudio, es similar, o superior, a los reportados por otros investigadores (Lanciotti *et al*, 1992; Chungue *et al*, 1993, Reynes *et al*, 1994; Sudiro *et al*, 1997; Rosario *et al*, 1998; Balmaseda *et al*, 1999); el índice de especificidad, sin embargo, fue menor (Deubel *et al*, 1990; Lanciotti *et al*, 1992; Chungue *et al*, 1993, Sudiro *et al*, 1997; Rosario *et al*, 1998; Balmaseda *et al*, 1999). Esta menor especificidad sugiere que se pudieran estar detectando muchos falsos positivos, los cuales contribuirían también

a reducir el índice de valor predictivo positivo. Aún cuando no descartamos totalmente esta eventualidad, las precauciones extremas tomadas para evitar contaminaciones (ver materiales y métodos), disminuyen la probabilidad de ocurrencia de falsos positivos. Adicionalmente, al repetir los análisis de algunas muestras la RT-PCR demostró una mayor reproducibilidad que el AIV (63,6% vs 33,3%). Finalmente, muchos sueros llegaron al laboratorio con más de una semana de retraso y en condiciones de preservación previas desconocidas. Esto pudo haber afectado la viabilidad del virus y contribuido a disminuir la sensibilidad de la técnica de AIV (Rigau-Pérez *et al*, 1998; Vorndam & Kuno, 1997). Consideramos, entonces, que muchos de estos falsos positivos de la RT-PCR fueron más bien infecciones que no pudieron detectadas por el AIV.

La Figura 1 muestra el patrón típico de migración electroforética de los amplicones de cada serotipo del VD obtenidos mediante RT-PCR de ARN virales extraídos de suero de pacientes con dengue (Canales 1, 3, 4 y 6), los cuales se corresponden con las reportadas por otros investigadores (Lanciotti *et al*, 1992; Harris *et al*, 1998; Rosario *et al*, 1998; Balmaseda *et al*, 1999). Cabe destacar la detección de un paciente con infección mixta por Den 2 y Den 4 con la técnica de RT-PCR (Figura 1, canal 7), y que fue tipificada por el AIV como Den 2. Las infecciones mixtas han sido reportadas en áreas donde circulan simultáneamente dos o más serotipos (hiperendémicas) durante los períodos epidémicos (Maneekarn *et al*, 1993; Rocco *et al*, 1998; Lorono-Pino *et al*, 1999). No es común, sin embargo, su detección mediante el AIV (Rocco *et al*, 1998). En Venezuela no existen reportes previos acerca de este evento.

Una condición deseable en una técnica de laboratorio para el diagnóstico de una enfermedad de rápida evolución clínica y transmisión como el dengue, debería ser que tenga una buena sensibilidad para detectar la infección en los días iniciales de la enfermedad. Tal como se observa en la Figura 2, las tasas de positividad obtenidas con RT-PCR fueron consistentemente mayores que las encontradas con las otras técnicas durante toda la fase de estado de la enfermedad, excepto en el quinto DIE donde fue superada por el MAC-ELISA (46% vs 35%). También, es posible obtener tasas de positividad bastante aceptables en el primer DIE (30%; Figura 2) y sexto DIE (38,5%, resultados no mostrados). Sudiro *et al* (1997) reportan la detección del VD por RT-PCR desde del primer día hasta 3 días después de la desaparición de la fiebre (octavo DIE). Las tasas de detección obtenidas en nuestro estudio con la RT-PCR resultan bastante aceptables y convenientes para sistemas de vigilancia epidemiológica, o de atención médica, donde la mayoría de los pacientes son atendidos entre el tercero y sexto DIE.

Entre el AIV y la RT-PCR, esta última fue la única técnica que permitió la detección del VD en tejidos (hígado, bazo, corazón y pulmón) de autopsia de 4 casos fallecidos por FHD/SCD. Este hallazgo es de particular importancia para las morgues (como la del Hospital Central de Maracay) donde realizan autopsias hasta 10 horas después de fallecido el paciente, lo que hace prácticamente imposible la detección de la infección por la técnica de AIV. La confirmación de los fallecidos por FHD/SCD es obligatoria en todos los programas de control y prevención del dengue y permite, entre otras cosas, asociar determinados serotipos con la severidad de la enfermedad (Gubler, 1989; Organización Panamericana de la Salud, 1995; Rigau-Pérez *et al*, 1998;



*Número de muestras positivas/Número de muestras examinadas

[†]Días de inicio de la enfermedad (DIE)

Fig. 1.- Tasas de positividad de las técnicas RT-RCP, AIV, MAC-ELISA e IHA (Títulos= \geq 1/2560) durante las fases iniciales del dengue.

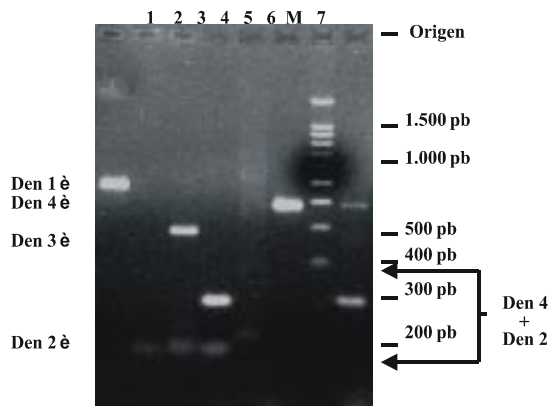


Fig. 2.- Gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio, que demuestra los amplicones de VD obtenidos mediante RT-PCR [15] de ARN extraídos de sueros de pacientes con dengue. Canal 1: Den 1 (482 pb); canal 2: suero control negativo; canal 3: Den 3 (290 pb); canal 4: Den 2 (119 pb); canal 5: agua destilada (control de extracción de RNA); canal 6: Den 4 (392 pb); canal M: 100 bp DNA ladder (Promega); canal 7: infección mixta Den 2 – Den 4.

World Health Organization, 1997; Gubler, 1998). En los casos fallecidos de Aragua, la relación de fallecidos por Den 1 y Den 2 fue igual, por lo que no fue posible determinar ninguna asociación entre serotipos y la severidad del dengue. Contrariamente, una muestra de pacientes sobrevivientes ($n = 907$) infectados con virus Den 2, tuvieron un mayor factor de riesgo de padecer FHD/SCD que los infectados con Den 1 ($OR = 2,96$; $LC95\% = 1,88 - 4,61$; χ^2 de Mantel-Haenszel = $26,77$; $p = 0,0000$). La mayoría de las epidemias de FHD/SCD que han ocurrido en las islas del Caribe, Centro y Sur América han sido ocasionados por el serotipo Den 2, genotipo asiático (Pinheiro, 1989; Anonymous, 1990; Guzmán *et al*, 1995; Organización Panamericana de la Salud, 1995; Larrea *et al*, 1997; Rico-Hesse *et al*, 1997; Balmaseda *et al*, 1999).

Las cualidades de la RT-PCR para detectar las infecciones por VD en muestras únicas colectadas en los primeros cinco días de la enfermedad, con tasas de positividad mayores que las de el AIV y las pruebas serológicas MAC-ELISA e IHA, alta sensibilidad (100%) y aceptable especificidad (73,5%) en relación con el AIV, y eficacia y rapidez para obtener resultados en los cuatro días iniciales de la enfermedad, la convierten en una poderosa herramienta para la vigilancia epidemiológica proactiva. Su utilización rutinaria en el programa de prevención y control del dengue del estado Aragua, contribuirá sustancialmente con la meta de la vigilancia proactiva que es predecir y prevenir epidemias mediante la detección temprana de la actividad viral.

SUMMARY

An effective proactive surveillance system for dengue requires fast and reliable laboratory techniques that can detect early viral transmission to predict outbreaks well before they occur. In that sense, the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) is a good choice that has been used successfully in proactive surveillance systems of Central and South America. In this study we compare the diagnostic qualities for an early confirmation of dengue infections of the RT-PCR, viral isolation in C6/36 cells and serotyping with anti-dengue monoclonal antibodies (VIT), IgM capture enzyme-linked immunosorbent assay (MAC-ELISA) and the hemagglutination-inhibition (HI) techniques. For this study, we used 1,019 sera from patients enrolled by the proactive surveillance system of the Aragua State, Venezuela. The results showed that RT-PCR had: a) higher positive rates than VIT, MAC-ELISA or HI, b) high sensitivity (100%) and acceptable specificity (73.5%) related to VIT, and c) good performance with fast results within the first four days of illness. These qualities made it a powerful tool for dengue proactive surveillance.

KEY WORDS: Dengue, Proactive Surveillance, Dengue Diagnosis, RT-PCR, MAC-ELISA.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos al personal de CORPOSALUD ARAGUA por su eficiente desempeño en el programa regional de vigilancia proactiva; a la Fundación para la Ciencia y la Tecnología del Estado Aragua (FUNDACITE ARAGUA), CORPOSALUD ARAGUA, la Dirección de Contraloría y Saneamiento Ambiental del Ministerio de Salud y Desarrollo Social (M.S.D.S.) y la Universidad de Carabobo, por crear y sostener al LARDIDEV; al Center for Diseases Control and Prevention, Fort Collins, Colorado, y San Juan, Puerto Rico, por su desinteresada asesoría y provisión constante de monoclonales anti-dengue, antígenos de VD, sueros de referencia, células C6/36 y Vero; al Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", por proveernos de Kits diagnóstico MAC-ELISA y ELISA para Rubéola y Sarampión; a la Sección de Arbovirus del Instituto de Investigaciones Veterinarias (IIV-CENIAP-FONAIAP), por proveernos de reactivos para la IHA; al Dr Robert Shope, de la Universidad de Texas, Galveston, Texas, EUA, por proveernos de antígenos de VD, y al Dr. Ferdinando Liprandi, del Laboratorio de Biología de Virus, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), por proveernos el aislado de virus Den 3.

REFERENCIAS

- Anonymous. (1990). Dengue hemorrhagic fever in Venezuela. *Epidemiol. Bull. PAHO*. **11**: 7-9.
- Balmaseda A., Sandoval E., Perez L., Gutierrez C.M. & Harris E. (1999). Application of molecular typing techniques in the 1998 dengue epidemic in Nicaragua. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **61**: 893-897.
- Chungue E., Roche C., Lefevre M.F., Barbazan P. & Chanteau S. (1993). Ultra-rapid, simple, sensitive, and economical silica method for extraction of dengue viral RNA from clinical specimens and mosquitoes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.* **40**: 142-145.
- Clarke D.H. & Casals J. (1958). Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **7**: 561-573.
- Delidow B.C., Lynch J.P., Peluso J.J. & White B.A. (1993). Polymerase Chain Reaction: Basic protocols. En: *PCR Protocols: Currents methods and applications*. Ed. B.A.White. Human Press Inc, Totowa, N.J., E.U.A. 1993: 1-28.
- Deubel V., Laille M., Hugnot J.P., Chungue E., Guesdon J.L., Drouet, M.T. *et al.* (1990). Identification of dengue sequences by genomic amplification: Rapid diagnosis of dengue virus serotypes in peripheral blood. *J. Virol. Methods.* **30**: 41-54.
- Gubler D.J. (1989). Surveillance for dengue and dengue hemorrhagic fever. *Bull. Pan Am. Health Organ.* **23**: 397-404.
- Gubler D.J. (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 480-496.
- Gubler D.J., Kuno G., Sather G.E., Velez M. & Oliver A. (1984). Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **33**: 158-165.
- Gubler D. & Clark G. (1995). Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg. Infect. Dis.* **1**: 55-57.
- Guzmán M.G., Deubel V., Pelegrino J.L., Rosario D., Marrero M., Sariol C. *et al.* (1995). Partial nucleotide and aminoacid sequences of the envelope and the envelope/nonstructural protein-1 gene junction of four dengue-2 virus strains isolated during the 1981 Cuban epidemic. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **52**: 241-246.
- Harris E., Belli A. & Agabian N. (1996). Appropriate transfer of molecular technology to Latin America por Public Health and Biomedical Sciences. *Biochem. Educ.* **24**: 3-12.
- Harris E., Roberts T.G., Smith L., Selle J., Kramer L.D., Valle S. *et al.* (1998). A Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 2634-2639.
- Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". (1995). Elisa de captura de IgM. En: *Técnicas de laboratorio para el diagnóstico de dengue*. IPK, La Habana, 53 – 55 pp.
- Kuno G., Gomez I. & Gubler D.J. (1987). Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **36**:153-159.
- Lanciotti R.S., Calisher C.H., Gubler D.J., Chang G.J. & Vorndam A.V. (1992). Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 545-551.
- Larrea F., Salas H., Montiel L., Godoy O., Bañuelos A., Prieto de Abreu M. *et al.* (1997). El dengue en Venezuela. 3.- Aragua: un estado afectado por el dengue. En: *Temas de Epidemiología: El dengue y el Sarampión en Venezuela*. Ed. F. Larrea, H. Salas, L. Montiel, O. Godoy, A. Bañuelos, M. Prieto de Abreu *et al.*, MSAS/OMS/OPS Caracas, Venezuela, 17-18 pp.
- Lorono-Pino M.A., Cropp C.B., Farfan J.A., Vorndam A.V., Rodríguez-Angulo E.M., Rosado-Paredes E.P. *et al.* (1999). Common occurrence of concurrent infections by multiple dengue virus serotypes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **61**: 725-730.
- Maneekarn N., Morita K., Tanaka M., Igarashi A., Usawattanakul W., Sirisanthana V. *et al.* (1993). Applications of polymerase chain reaction for identification of dengue viruses isolated from patient sera. *Microbiol. Immunol.* **37**: 41-47.
- Ministerio de Sanidad y Asistencia Social. (1998). Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Boletín Epidemiológico. Resumen enero – diciembre, MSAS, Caracas, Venezuela, 2 pp.
- Organización Panamericana de la Salud (1995). Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: Guías para su prevención y control. Publicación Científica No. 548, OPS, Washington, D.C., E.U.A., 23 – 34 pp.
- Pinheiro F.P. (1989). Dengue in the Americas. 1980-1987. *Epidemiol. Bull.* **10**: 1-8.
- Reynes J.M., Laurent A., Deubel V., Telliam E. & Moreau J.P. (1994). The first epidemic of dengue hemorrhagic fever in French Guiana. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **51**: 545-553.
- Rico-Hesse R., Harrison L.M., Salas R.A., Tovar D., Nisalak A., Ramos C. *et al.* (1997). Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology.* **230**: 244-251.
- Rigau-Pérez J.G., Clark G.G., Gubler D.J., Reiter P., Sanders E. & Vorndam A.V. (1998). Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet.* **352**: 971-977.
- Rocco I.M., Barbosa M.L. & Kanomata E.H.N. (1998). Simultaneous infection with Dengue 1 and Dengue 2 in a brazilian patient. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* **40**: 151-154.
- Rosario D., Alvarez M., Díaz J., Contreras R., Rodríguez R., Vásquez S. & Guzmán M.G. (1998). Reacción en cadena de la polimerasa para la detección rápida y determinación del serotipo

del virus del dengue en muestras clínicas. Rev. Panam. Salud Publica. **4**: 1-5.

Sudiro T.M., Ishiko H., Green S., Vaughn D.W., Nisalak A., Kalayanarooj S. *et al*, (1997). Rapid diagnosis of dengue viremia by reverse transcriptase-polymerase chain reaction using 3'-noncoding region universal primers. Am. J. Trop. Med. Hyg. **56**: 424-429.

Vorndam V. & Kuno G. (1997). Laboratory diagnosis of dengue virus infections. En: Dengue and dengue hemorrhagic fever. Ed. D.J. Gubler & G. Kuno. CAB International, Wallingford, U.K., 313-334 pp.

World Health Organization. (1997). Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control, 2nd edition. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 34-47 pp.