
Diagnóstico molecular y serológico de un brote de dengue en Coro, estado Falcón, Venezuela.

Zoila Caridad Moros¹, María Jesús Abad², Miriam Arsenak², Dilia Martínez³, María Magdalena Cierco⁴, Asunta Costagliola³, Leyda Urbina³, Peter Taylor², Ferdinando Liprandi¹ y Flor Helene Pujol¹.

¹Laboratorio de Biología de Virus, Centro de Microbiología y Biología Celular.

²Laboratorio de Patología Celular y Molecular, Centro de Microscopía Electrónica. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas.

³Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda.

⁴Hospital Universitario Dr. Alfredo Van Grieken. Coro, estado Falcón, Venezuela.

Palabras claves: Dengue, respuesta inmunitaria, serotipos, viremia.

Resumen. El virus dengue (VD) es responsable de un espectro de enfermedades que van desde una enfermedad febril autolimitante (FD, fiebre por dengue) hasta las formas severas, fiebre hemorrágica/síndrome de shock por dengue (FHD/SSD). El propósito del presente estudio fue la confirmación serológica y molecular de un brote de dengue en el Estado Falcón, Venezuela con la finalidad de confirmar la etiología de la enfermedad, determinar los serotipos infectantes y la relación del diagnóstico clínico con las respuestas inmunitarias en los pacientes con infección activa. Se analizaron 54 sueros de pacientes con diagnóstico clínico de infección por VD, mediante inmunoensayos enzimáticos desarrollados en Venezuela (ELISA, IgM e IgG) y por PCR. El 78% de los pacientes mostró evidencia de infección por VD (PCR⁺ y/o IgM⁺), 48% presentaron viremia demostrada por PCR⁺ y 57% resultaron positivos a IgM, lo que sugiere que un alto número de los casos reportados como dengue en el país se deben efectivamente a la infección por VD. Un hecho resaltante fue el alto porcentaje (76%) de pacientes con infección pasada o secundaria al VD (IgG positivos), dentro de los cuales se encontraban la totalidad de los pacientes diagnosticados clínicamente con FHD (n=8). De los pacientes PCR positivos, el 27% correspondió al serotipo 1, 54% al serotipo 2 y 19% al serotipo 4. Para el momento de esta evaluación no se determinó la presencia del serotipo 3, aunque se conocía de su presencia en la cercana Isla de Aruba. La combinación de métodos serológicos y moleculares nos permitió obtener una información bastante precisa de este brote.

Molecular and serological diagnostic of an outbreak of dengue in Coro, estado Falcón-Venezuela.

Invest Clín 2003; 44(3): 219 - 226

Key words: Dengue, immune response, serotype, viremia

Abstract. Dengue virus (DV) is responsible for a spectrum of diseases, from a self-limited fever disease (DF, dengue fever) to the more severe forms of hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). The aim of this study was the serological and molecular confirmation of an outbreak of dengue in Falcon state, Venezuela. A total of 54 sera from patients with clinical diagnosis of DV infection were analyzed by an enzyme immunoassays developed in Venezuela (ELISA -IgM e -IgG) and by PCR. From them, 78% exhibited DV infection (PCR⁺ y/o IgM⁺), 48% exhibited viremia by PCR and 57% were positive to IgM. An interesting observation was the high percent (76%) of patients with past or secondary infection (IgG positive), which included all the patients exhibiting clinical symptoms of DHF (n=8). From the PCR positive sera, serotype 1 was found in 27%, serotype 2 in 54% and serotype 4 in 19%. No serotype 3 was found circulating in this population, although this serotype was already circulating in the nearby island of Aruba. The combination of serological and molecular methods allow us to obtain a fairly precise information of this outbreak.

Recibido: 16-06-2002. Aceptado: 26-05-2003.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones por el virus dengue (VD), son un problema de salud pública en las áreas tropicales y subtropicales del mundo. Se han identificado cuatro serotipos de virus dengue (VD-1, 2, 3 y 4); cada uno de ellos puede infectar humanos y causar enfermedad (1, 2). Las manifestaciones clínicas de la enfermedad van desde una fiebre aguda indiferenciada hasta las formas severas, conocidas como fiebre hemorrágica por dengue (FHD) y síndrome de shock por dengue (SSD) (3, 4). La ocurrencia de FHD/SSD ha sido fuertemente asociada con la infección secuencial de un mismo individuo con dos serotipos diferentes de VD. Una primera infección, con cualquiera de los serotipos del virus, parece conferir inmunidad contra la reinfección con el mismo serotipo, y una in-

munidad a muy corto plazo contra serotipos heterólogos del VD (5-7).

El diagnóstico de laboratorio para la infección por VD generalmente involucra la detección de anticuerpos contra el virus por ensayos de hemaglutinación o ELISA (8). Estos ensayos no son rápidos ni de fácil manipulación, y sólo en algunas infecciones primarias se puede eventualmente inferir mediante ELISA el serotipo responsable de la infección, no así en infecciones secundarias (9). Las características más importantes para la selección e interpretación de los estudios serológicos son el tiempo necesario para detectar los anticuerpos circulantes y la reactividad cruzada de los anticuerpos que se producen. Cuando se compara la cinética de IgM e IgG para el VD, la respuesta de anticuerpos en una infección primaria es marcadamente diferente a la que

ocurre en una infección secundaria. El anticuerpo IgM tiende a alcanzar niveles detectables en sangre durante la fase aguda de la enfermedad y persiste alrededor de 60 a 90 días, por lo que se le considera como un buen indicador de infección reciente (10).

En infecciones primarias por dengue, el anticuerpo IgG aparece unos días después que la IgM. Los títulos continúan aumentando lentamente por unas semanas y permanecen detectables por muchos años o por el resto de la vida (10). En una infección secundaria por Flavivirus, ocurre la respuesta anamnésica IgG, lo que resulta en un rápido aumento del título, casi inmediatamente después del inicio de la enfermedad (11). Debido a la persistencia del anticuerpo IgG y su prevalencia en áreas endémicas, una simple muestra de suero demostrando la presencia de este anticuerpo tiene significado clínico limitado, por lo que la presencia de IgG como método diagnóstico depende de la toma de muestras pareadas que demuestren un cambio de título de por lo menos cuatro veces, entre la fase aguda y convaleciente, a menos que la muestra única posea un título sugestivo de infección secundaria (12).

Por lo engorroso de la interpretación de la serología y debido a que los síntomas de la infección por dengue no son específicos, el médico debe estar familiarizado con la enfermedad y el diagnóstico definitivo únicamente es posible una vez que el agente infeccioso es identificado como virus dengue y no como otro Flavivirus, caso en el cual pudiese estar ocurriendo reactividad cruzada. Entre las técnicas virológicas más utilizadas en el diagnóstico de la enfermedad está el aislamiento e identificación del virus, mediante la prueba de PCR, o por detección de antígenos virales usando anticuerpos monoclonales tipo-específicos en estudios inmunohistoquímicos (12).

La epidemiología del dengue en Venezuela, desde 1989 hasta el año 2000, se ha

visto caracterizada por epidemias recurrentes prácticamente cada año, con la circulación simultánea de los serotipos 1, 2 y 4 (13). Esta es una situación típica de hiperendemicidad, similar a la observada durante los últimos 20 años en el sureste asiático y asociada a una alta incidencia de FHD/SSD (13). El Estado Falcón ha sido uno de los estados más afectados en Venezuela por el VD desde 1998, incluso llegando a reportarse epidemias de dengue en estos últimos años (14-16). En este trabajo se describió un brote por VD en la ciudad de Coro, Estado Falcón, Venezuela, con la finalidad de: confirmar la etiología de la enfermedad, determinar los serotipos circulantes y relacionar del diagnóstico clínico con las respuestas inmunitarias en los pacientes con infección activa que para ese momento no había sido reportado.

PACIENTES Y MÉTODOS

Pacientes

Se evaluaron 54 sueros de pacientes con indicación clínica sugestiva de infección por dengue, de los cuales ocho fueron remitidos como FHD. Todos los sueros fueron recolectados entre Noviembre de 1999 y Febrero del 2000 y provenían del Hospital Universitario Dr. Alfredo Van Grieken, Coro, Estado Falcón, de pacientes residentes de la zona. El diagnóstico de infección por dengue se hizo según los criterios recomendados por la Organización Mundial de la Salud (17). Todas las muestras fueron tomadas entre los 6 primeros días de iniciados los síntomas de la infección con un 83% (45/54) en los primeros 3 días. Las edades de los pacientes estuvieron comprendidas entre los 18 meses y 74 años e incluyeron 24 mujeres y 30 hombres.

Determinación de anticuerpos anti-VD

Los anticuerpos IgM e IgG fueron detectados mediante los estuches de diagnós-

tico Dengue-Gnostic IgM "PharmaTest" y Dengue-Gnostic IgG "Pharmatest" desarrollados en Venezuela, según las instrucciones del fabricante. Estos se basan en micro-ELISA de captura en fase sólida, de anticuerpos séricos del isotipo IgM (MAC-ELISA) e IgG (GAG-ELISA) anti-VD (cualquier serotipo) respectivamente.

Diagnóstico molecular

Se siguió el protocolo de Lanciotti y col. (18) con algunas modificaciones. El ARN fue extraído de 200 μ L de suero de los pacientes usando el Trizol Reagent (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El precipitado de ARN seco fue resuspendido en una mezcla de agua: RNAsin (40:1). La muestra (10 μ L) fue añadida a la mezcla que contenía agua (9 μ L), 333 μ M de cebador antisentido y 40 U de RNAsin. La mezcla se incubó a 65°C por 10 min., se dejó enfriar sobre hielo por 10 min. Se le agregó 10 μ L de una solución con tampón Superscript II RT (50mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, pH 8,3; Invitrogen), 10mM DTT, 0,66 mM de cada oligonucleótido (Promega) y 200U de transcriptasa reversa (Superscript II, Invitrogen). La mezcla se incubó en agitación a 37°C por tres horas y se conservó a -20°C hasta su posterior uso.

La PCR consistió en dos rondas de amplificación (18) la cual permite identificar cualquiera de los serotipos circulantes de VD (D1, D2, D3 y D4). Estos serotipos generan productos equivalentes a 482, 119, 290 y 390 pares de bases respectivamente. El tamaño de estos productos se estimó por su posición en un gel de agarosa al 2%, después de una electroforesis y posterior visualización con luz ultravioleta (UV), en presencia de un marcador de peso molecular (1 Kb Plus Ladder, Life Technologies). En cada prueba se incluyeron controles positivos.

RESULTADOS

En este estudio, la determinación del genoma viral por PCR se realizó en el suero de 54 pacientes, diagnosticados clínicamente con infección por VD. La edad del grupo afectado estuvo entre los 18 meses y 74 años. El 37% (20/54) de los pacientes fue menor de 12 años. Los resultados indican que el genoma viral (PCR+) fue detectado en el 48% (26/54) de los pacientes, indicando infección activa, primaria o secundaria. El dengue 2 fue el serotipo dominante (14/26; 54%), seguido por el dengue 1 (7/26; 27%) y dengue 4 (5/26; 19%), observándose ausencia del serotipo 3.

Por MAC-ELISA resultaron positivos para VD 57% (31/54) de los sueros evaluados y por GAG-ELISA 76% (41/54). En la Tabla I se muestran los tipos de infecciones y de respuestas inmunitarias que cursaban estos pacientes. De los que tenían infección activa (PCR+), 88% (23/26) presentaron anticuerpos IgG anti-VD asociados con una respuesta inmunitaria secundaria, el resto (12%, 3/26) correspondió con el patrón de respuesta inmunitaria primaria (PCR+, IgG-).

Al 52% (28/54) de los sueros evaluados no se les encontró viremia activa (PCR-) pero el 30% (16/54) presentaron IgM anti-VD (IgM+), indicando probablemente una infección reciente. También observamos que un 9% mostraron evidencia de infección pasada, al presentar IgG anti-VD positiva (IgG+) con viremia e IgM negativas.

Clínicamente fueron diagnosticados 8 pacientes (15%; 8/54) con FHD, de los cuales 88% (7/8) tuvo infección activa comprobada (PCR+); 86% (6/7) de éstas fueron ocasionadas por el serotipo 2 y 14% (1/7) por el serotipo 1. La totalidad de este grupo de pacientes estaba cursando infección por VD secundaria reciente, ya que para el momento de la evaluación presentaron tanto anticuerpos IgM como IgG.

TABLA I
 TIPO DE INFECCIONES Y RESPUESTAS INMUNITARIAS HUMORALES (IGM Y/O IGG)
 OBSERVADAS EN PACIENTES (n = 54) CON MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE DENGUE,
 DE UN BROTE EPIDÉMICO EN CORO, ESTADO FALCÓN, VENEZUELA

Tipo de Infección	Porcentaje (n/total)
Activa (PCR ⁺)	48% (26/54)
- Con respuesta humoral primaria (IgG ⁻)	11% (3/26)
- Con respuesta humoral secundaria (IgG ⁺) ^a	89% (23/26)
Reciente (PCR ⁻ /IgM ⁺)	30% (16/54)
Pasada (PCR ⁻ /IgM ⁻ /IgG ⁺)	9% (5/54)
Sin marcadores para infección por VD (PCR ⁻ , IgM ⁻ e IgG ⁻)	13% (7/54)

^a88% (7/8) de los pacientes con cuadro clínico compatible con FHD tenían este tipo de infección (activa-secundaria).

DISCUSIÓN

En Venezuela en las últimas décadas, ha ocurrido un significativo aumento en la actividad del dengue, lo que ha sido un grave problema de salud pública en el país. En general el diagnóstico clínico de la infección por VD debe ser diferencial con otros síndromes febriles, ya que los síntomas de esta infección son similares a los que se presentan en otras infecciones virales o bacterianas. Es importante destacar que el acceso a las pruebas confirmatorias de infección por VD como son la serología, en primera instancia y la confirmación viral, sólo son practicadas en las grandes ciudades, siendo inaccesibles en la mayoría de los estados del territorio nacional y entre ellos el Edo. Falcón.

En el presente estudio, se utilizó la combinación de las técnicas de RT-PCR, MAC- y GAG-ELISA para confirmar el diagnóstico clínico de dengue, durante el desarrollo de un brote epidémico en una población venezolana (Coro-Edo. Falcón). Este tipo de diagnóstico nos permitió confirmar la presencia de infección activa por VD en 48% de los pacientes e infección activa o reciente en un 78%, lo cual evidencia una buena correlación con el diagnóstico clínico efectuado.

Aquí es importante destacar que el tiempo de recolección de las muestras es crucial en la interpretación de los resultados de la PCR por la duración de la viremia. La viremia comienza antes de la aparición de los signos y/o síntomas del dengue, es decir, durante el período de incubación y alcanza su máxima expresión al final de dicho período o al inicio del cuadro clínico. A partir de ese momento, comienza a decaer rápidamente, para desaparecer (casi coincidencialmente) con la ausencia del cuadro febril (5^{to} a 6^{to} día después de la aparición de los primeros signos y/o síntomas de la enfermedad) (19). Por ello es imprescindible la toma de la muestra de sangre durante el período febril de la enfermedad, es decir en los primeros cinco días y de ser posible, en las primeras 72 horas, de manera de garantizar la presencia del genoma viral en las muestras infectadas. En este grupo de pacientes la mayoría (83%) de las muestras fueron tomadas entre los tres primeros días de iniciados los síntomas de la infección, lo que podía garantizar viremia activa y por tanto la detección viral por PCR.

Uno de los mayores inconvenientes de utilizar IgM como único método diagnóstico de infección por VD, es que no permite detectar infección viral en un número im-

portante de muestras, si ésta se extrae al inicio de la infección, cuando todavía los niveles de IgM no se han elevado (10). Esto precisamente fue corroborado en este estudio, al encontrar que un alto porcentaje (42%, 11/26) de los pacientes en fase vírica (PCR+) no presentaron niveles detectables de IgM.

Se observó el predominio de la circulación del VD serotipo 2. Es importante destacar la ausencia del serotipo 3, que para ese momento aún no se había reportado en Venezuela. Sin embargo, sí se conocía de la circulación de este serotipo en la Isla de Aruba. Dada la cercanía geográfica de esta isla con la localidad evaluada (Coro-Edo. Falcón, Venezuela) existía la posibilidad de entrada al país del serotipo 3 por esta región, en donde se desarrollaba una epidemia del VD.

El alto porcentaje de infecciones secundarias encontradas (89%, 23 IgG+ de 26 PCR+) se puede atribuir a la co-circulación de tres de los cuatro serotipos del VD, que hace a la población más propensa a desarrollar este tipo de afección. En la actualidad existen pocos reportes sobre la prevalencia de exposición a VD en la población venezolana, después de que se instauró la situación de hiperendemicidad. Valero y col. (20) reportaron para el año 1996 un 41,9% de prevalencia de anticuerpos IgG anti-VD en una municipalidad del Edo. Zulia. La prevalencia de IgG observada en este estudio fue aún mayor (76%). Esto es debido quizá a la composición sesgada de la muestra evaluada (pacientes con manifestación clínica) y a diferencias regionales pero probablemente también sea un reflejo de la creciente exposición a VD en todo el territorio nacional.

De los 54 pacientes estudiados, 8 fueron reportados clínicamente como FHD y de ellos 7 fueron confirmados al detectarse viremia positiva (PCR+) e IgG (IgG+). En este grupo particular (FHD) se encontró

que 6 pacientes resultaron serotipo 2 (86%, 6/7), 1 paciente serotipo 1. Existen distintos factores que podrían estar jugando un rol en el desarrollo de la FHD: 1) infección secuencial con la eventual participación de anticuerpos facilitadores (4, 21, 22) o respuesta celular cruzada (23), 2) virulencia de la cepa (24, 25) y 3) factores asociados al huésped tales como el contexto inmunogenético y la raza (26-29).

El importante destacar que el genotipo del VD-2 asiático ha sido asociado con un alto potencial de provocar FHD y es precisamente de procedencia asiática el VD-2 que desde 1989 circula en Venezuela (13, 25, 30).

Sólo en el 13% de la totalidad de los pacientes con diagnóstico clínico de FD/FHD, no se les confirmó ni evidencia viral ni serológica indicativa de infección por VD (PCR-, IgM- e IgG-). No se puede discernir en estos paciente si se encontraban en un período de ventana (infección primaria con descenso de viremia sin desarrollo aún de IgM) o cursaban otra enfermedad, posiblemente de etiología viral.

El objeto de un sistema activo de vigilancia basado en pruebas de laboratorio es proporcionar a los funcionarios de la salud pública información temprana y precisa que permita la detección precoz de los casos de dengue y, por tanto, mejorar la capacidad de los servicios de salud pública para prevenir y controlar la propagación de la enfermedad. Los boletines epidemiológicos nacionales basan el reporte de casos de dengue en el diagnóstico clínico de la enfermedad. Este estudio mostró que la infección por VD pudo ser demostrada en 78% de los casos (viremia positiva y/o presencia de IgM), sugiriendo que un alto número de los casos de dengue reportados en el país son efectivamente debidos a la infección por este virus. La alta frecuencia de evidencia de infección por VD coincide con el hecho de que el estado Falcón fue uno de los

estados donde se reportó situación de epidemia para el momento de esta evaluación (15).

Estos resultados sugieren que el Edo. Falcón presenta niveles de endemicidad comparables con otros estados donde se ha descrito la actividad por VD. La combinación de los métodos serológicos empleados permitió obtener una información bastante precisa del brote estudiado. La disponibilidad de sistemas diagnósticos nacionales, tanto serológicos como moleculares, permite reforzar el sistema de vigilancia necesario para este importante problema de salud pública.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado mediante el proyecto de Grupo G-98002081 del CONICIT, Venezuela.

REFERENCIAS

1. **Pinheiro FP, Corber SJ.** Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *World Health Stat Q* 1997; 50:161-169.
2. **Rigau-Pérez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV.** Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 1998; 352:971-977.
3. **Gubler DJ, Clark GG.** Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis* 1995; 1:55-57.
4. **Halstead SB.** Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 1988; 239:476-481.
5. **Halstead SB, Shotwell H, Casals J.** Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. 1. Clinical laboratory responses to primary infection. *J Infect Dis* 1973; 128:7-13.
6. **Halstead SB.** Etiologies of the experimental dengues of Siler and Simmons. *Am J Trop Med Hyg* 1974; 23:974-982.
7. **Scherer WF, Breakenridge FA, Dickerman RW.** Cross-protection studies and search for subclinical disease in new world monkeys infected sequentially with different immunologic types of dengue viruses. *Am J Epidemiol* 1972; 95:67-79.
8. **Guzmán MG, Kourí G.** Advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996; 3:621-627.
9. **Chunge E, Boutin JP, Roux J.** Significance of IgM titration by an immunoenzyme technique for the serodiagnosis and epidemiological surveillance of dengue in French Polynesia. *Res Virol* 1989; 140: 229-240.
10. **Gubler DJ, Sather G.** Laboratory diagnosis of dengue and dengue hemorrhagic fever. *Proceedings of the International Symposium on Yellow Fever and Dengue, Rio de Janeiro, Brasil, 1988.* p 15-19.
11. **Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdechariya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S, Puffisri P, Hoke CH.** An enzyme-linked immunoassay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 40:418-427.
12. **Vorndam V, Kuno G.** Laboratory diagnosis of dengue virus infections. In: *Dengue and dengue hemorrhagic fever.* Gubler DJ, Kuno G. Eds. Wallingford, UK: CAB International. 1997; p 313-334.
13. **Salas RA, Tovar D, Barreto A, Miller E, Leitmeyer K, Rico-Hesse R.** Serotipos y genotipos de virus dengue circulantes en Venezuela, 1990-1997. *Acta Cient Venez* 1998; 49:33-37.
14. **Boletín Epidemiológico Semanal. República de Venezuela.** Ministerio de Sanidad y Asistencia Social. Dirección General Sectorial de Malariología y Saneamiento Ambiental. Dirección de Vigilancia Epidemiológica. N° 51. 1997.
15. **Alerta.** Reporte epidemiológico semanal para el nivel gerencial. República de Venezuela. Ministerio de Salud y Desarrollo Social. N° 50. 1998.
16. **Alerta.** Reporte epidemiológico semanal para el nivel gerencial. República de Venezuela. Ministerio de Salud y Desarrollo Social. N° 52. 2001.
17. **World Health Organization.** Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment,

- prevention and control. 2nd edition. Geneva: World Health Organization. 1997 p12-23.
18. **Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam V.** Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30:545-551.
 19. **Gubler DJ, Suharyono W, Tan R, Abidin M, Sie A.** Viraemia in patients with naturally acquired dengue infection. *Bull World Health Organiz* 1981; 59:623-630.
 20. **Valero N, Añez F, Larreal Y, Arias J, Rodríguez Z, Espina LM.** Evaluación de la inmunidad contra los virus de Encefalitis Equina Venezolana y Dengue en la población humana de San Carlos, Municipio insular Almirante Padilla, Estado Zulia, Venezuela. Año 1996. *Invest Clin* 2001; 42:161-169.
 21. **Morens D.M.** Antibody-dependent enhancement of infection and pathogenesis of viral disease. *Clin Infec Dis* 1994; 19: 500-512.
 22. **Monath TP.** Dengue; The risk to development and developing countries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:2395-2400.
 23. **Rothman AL, Ennis FA.** Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. *Virology* 1999; 257:1-6.
 24. **Burke, DS, Nisalak, A, Johnson, PE, Scott, R McN.** A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg* 1988; 38:172-180.
 25. **Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas R, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, Boshell J, de Mesa MT, Nogueira RM, da Rosa AT.** Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 1997; 230:244-251.
 26. **Chiewsilp P, Scott RM, Bhamarapravati N.** Histocompatibility antigens and dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 1981; 30:1100-1105.
 27. **Bravo JR, Guzman M.G, Kouri GP.** Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 1. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1987; 81: 816-820.
 28. **Guzman MG, Kouri GP, Bravo J, Soler M, Vazquez S, Morier L.** Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 42:179-184.
 29. **Halstead SB, Streit TG, Lafontant JG, Putvatana R, Russell K, Sun W, Kanasa-Thanan N, Hayes CG, Watts DM.** Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65:180-183.
 30. **Uzcategui NY, Camacho D, Comach G, Cuello de Uzcategui R, Holmes EC, Gould EA.** Molecular epidemiology of dengue type 2 virus in Venezuela: evidence for in situ virus evolution and recombination. *J Gen Virol* 2001; 82: 2945-2953.