

Inmunidad a flavivirus en la población indígena de la Sierra de Perijá, estado Zulia, Venezuela.

Nereida Valero, Luz Marina Espina, Jesús Estévez, Eddy Meleán, Yraïma Larreal, Mery Maldonado, Julia Arias, Germán Añez, Florencio Añez y José Pirela.

Sección de Virología, Instituto de Investigaciones Clínicas "Dr. Américo Negrette".
Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.
Correo electrónico: nvalero@luz.edu.ve, nere98@hotmail.com

Palabras clave: Flavivirus, seroprevalencia, dengue, indígenas, Yukpas, Barí.

Resumen. Existe poca información acerca de la infección por Flavivirus en poblados amerindios del occidente de Venezuela, razón por la cual se determinó la actividad y seroprevalencia de los mismos y se analizó la hipótesis que sustenta la existencia de un ciclo selvático de transmisión de estas infecciones en poblaciones indígenas. Para ello, se recolectaron muestras de sangre en comunidades Yukpas (n = 144) y Barí (n = 110). De ellas, 35 muestras (Yukpas = 25 y Barí = 10) fueron procesadas por aislamiento en cultivo celular e identificación viral por RT-PCR. La determinación de anticuerpos IgG anti-Flavivirus se realizó a través de la técnica de ELISA. Los resultados obtenidos no evidenciaron casos activos de dengue y la seroprevalencia para IgG anti-Flavivirus en la población Yukpa fue significativamente mayor ($p < 0,0001$) que en la población Barí (43,1 vs 6,4%), evidenciándose inmunidad anti-Flavivirus en ambas poblaciones indígenas. Estos resultados muestran la existencia de una mayor seroprevalencia de Flavivirus en los Yukpas que en los Barí, lo cual sugiere una actividad continua de estos virus, principalmente en la población Yukpa. Sin embargo, en estas poblaciones las causas o factores que condicionan la presencia o llegada de casos son variadas y, posiblemente, están relacionadas con la estructura de los poblados y los hábitos de intercambio social. No se evidenció característica alguna que apoyara la presencia de un ciclo selvático en la transmisión de estos virus, especialmente del dengue, en esta población.

Immunity to flavivirus in amerindian population of the Sierra de Perijá, Zulia state, Venezuela.

Invest Clín 2004; 45(4): 337 - 345

Key words: Flavivirus, seroprevalence, dengue, amerindian population, Yukpas, Bari.

Abstract. Little information is available about Flavivirus infection in amerindian populations in western Venezuela. On this account the activity and seroprevalence of these viruses were determined and the hypothesis concerning the existence of a sylvatic cycle, conditioning the infection transmission of these viruses in indigenous populations, was studied. For this, blood samples from Yukpas (n=144) and Barí (n=110) communities were collected, 35 (Yukpas = 25 y Barí =10) of which were processed for viral isolation followed by RT-PCR. The anti-Flavivirus IgG antibodies were determined by ELISA. The results did not show active Dengue cases and the seroprevalence of anti-Flavivirus IgG in the Yukpa population was significantly higher ($p < 0,0001$) than in the Bari population (43,1% vs. 6,4%). The present study has determined the presence of Flavivirus immunity in Yukpa and Barí populations. These results show a higher prevalence at the former than in the Bari population, which suggests circulation of Flavivirus, mainly in the Yukpa communities, being scarce and sporadic in Bari villages. However, in the indigenous populations studied, the causes or factors that determine the off set of Flavivirus infections in these zones could vary. The detected prevalence between both communities may be due to differences in the structure settlements and social habits. No evidences were found to support the presence of a sylvatic cycle in the Flavivirus transmission, specially of Dengue, in this population.

Recibido:25-02-2004. Aceptado:17-06-2004.

INTRODUCCIÓN

El virus dengue es un miembro de la familia *Flaviviridae*, representado por cuatro serotipos virales antigénicamente relacionados (Den-1, 2, 3 y 4). Son biológicamente transmitidos a los humanos por mosquitos vectores, principalmente *Aedes aegypti* (1, 2). Su presencia se ha determinado en muchos países americanos y su amplia distribución y elevada morbilidad lo ha convertido en un problema de salud pública de los países tropicales, incluyendo a Venezuela (2-4). En esta población se ha observado

un incremento de los casos de dengue en los últimos años; en el Estado Zulia se registraron 7.535 casos de dengue para el año 2001 y 8.295 para el 2002, cifras que se correlacionan con el incremento de la morbilidad en el resto del país y del continente americano.

Poco se conoce acerca de las infecciones virales y en especial de Flavivirus como dengue y Fiebre amarilla, en las poblaciones extraurbanas o rurales e indígenas venezolanas, como las comunidades Yukpas y Barí de la Sierra de Perijá del Estado Zulia, Venezuela. Un estudio previo realizado por

Ryder (3) en 1967 en trece localidades del Estado Zulia determinó una seroprevalencia para dengue de 38% (162/431) incluyendo a la población del Tucuco de la Sierra de Perijá en la que se encontró un 21,62% (8/37). Otros estudios han demostrado un alto índice de riesgo y por ende de incidencia de infección para los virus de hepatitis y herpes (5, 6) en las poblaciones Yukpa y Bari, las cuales han resultado ser altamente endémicas para hepatitis B y D, muchos de los casos con superinfección y con severos episodios de hepatitis fulminante (7-9).

El presente estudio tiene como objetivo determinar la inmunidad contra Flavivirus en dos poblaciones amerindias de la Sierra de Perijá, Estado Zulia, Venezuela. Así mismo, se investigó la hipótesis sobre un posible ciclo selvático que condicione la transmisión de la infección en estas poblaciones indígenas.

PACIENTES Y MÉTODOS

Ubicación y descripción del área

La Sierra de Perijá se encuentra ubicada al Oeste del Estado Zulia. Es la parte septentrional de la Cordillera de Los Andes que conforma el límite occidental de la cuenca hidrográfica del Lago de Maracaibo en la zona fronteriza de Colombia y Venezuela. Está situada entre los 72° 15' y 73° 15' longitud W y los 9° 00' y 11° 10' latitud N en la América del Sur. Conforman un sistema natural que combina una rica diversidad de biomas (bosque seco tropical, húmedo tropical, muy húmedo montañoso bajo, muy húmedo montañoso y páramo). Las precipitaciones son abundantes (1.500-2.400 mm) con temperatura máxima de 30°C y mínima de 13°C (10, 11) (Fig. 1).

Población estudiada

Población Yukpa. Los Yukpas forman parte de una de las 7 poblaciones indígenas de origen caribe que han sobrevivido en Ve-

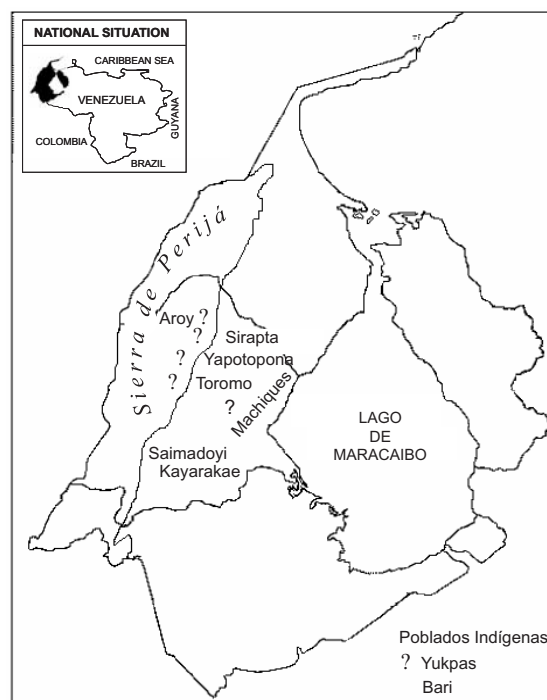


Fig. 1. Mapa del estado Zulia.

nezuela y abarcan aproximadamente 4.174 indígenas, ubicadas en aproximadamente 41 comunidades (12). En cuanto a los hábitos alimenticios, los Yukpas son principalmente cultivadores rotatorios que operan en una variedad de sistemas parciales de uso de tierra complementadas principalmente por actividades de caza, pesca y recolección (13).

La población se caracteriza por sus precarias condiciones sanitarias sin un adecuado sistema de disposición de excretas, no tienen agua potable y no cuentan con servicios asistenciales. En cuanto a la vivienda, la mayoría están construidas en líneas urbanizadas, una al lado de la otra, con paredes de bloques, techos de zinc y pisos de cemento, con una arquitectura tipo vivienda rural. El resto, que corresponde a la minoría, están distribuidas en forma desordenada y siguen el estilo de vivienda típica indígena Yukpa, las cuales carecen de paredes, piso y tienen solamente un techo

construido con hojas de plátano. Los poblados estudiados de estas comunidades fueron: Aroy, Sirapta, Yapotozona y Toromo.

Población Barí. Los Barí son de ascendencia Chibcha, tienen su asiento natural y milenario en la Sierra de Perijá, ubicados en zonas remotas y alejados de todo desarrollo industrial. Su patrón de asentamiento tradicional (agricultores, cazadores y pescadores) ha cedido para dar lugar a pequeños asentamientos familiares aislados que han pasado a desarrollar un sistema de horticultura en pequeña escala con reducción de la productividad y variedad de sus cultivos. Su consumo de proteínas de origen animal deriva principalmente de la pesca. No cuentan con abastecimiento de agua potable, por lo que sus necesidades las cubren a través de los ríos. Las condiciones sanitarias son semejantes a las anteriormente descritas para los Yukpas (14). Los poblados estudiados de estas comunidades fueron: Saimadoyi y Kayarakae.

Recolección de muestras

Se recolectaron 244 muestras de sangre (144 de la población Yukpa y 110 de la Barí) en el medio rural de cada comunidad. Las muestras (10 mL) fueron obtenidas por punción venosa y centrifugadas a 1.500 rpm por 10 minutos para la obtención del suero, los cuales fueron almacenados a una temperatura de -70°C en nitrógeno líquido hasta su procesamiento. A cada individuo se le llenó una ficha de recolección de datos para la identificación de arbovirus. Las muestras provenientes de pacientes con alguna sintomatología clínica asociada sugestiva o no de dengue (generalmente fiebre, malestar general y diarrea) al momento de la toma de la muestra ($n=35$, 25 Yukpas y 10 Barí) se procesaron por cultivo celular para aislamiento e identificación viral. El muestreo se realizó con el consentimiento previo de cada individuo.

Evaluación y tipificación virológica

Se realizó por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Inversa (RT-PCR) según el método desarrollado por Lanciotti y col. (15), a los cinco días de cultivadas las muestras en la línea celular C6/36 (16).

Serología

Debido a la alta reactividad cruzada entre Flavivirus, la determinación de anticuerpos IgG se realizó a través de la técnica de ELISA descrita por Kuno y col. (17), utilizando antígenos de los cuatro serotipos del virus dengue. Los resultados se expresaron cualitativamente como positivos o negativos, según los criterios de validación e interpretación de la prueba.

Análisis estadístico

Los datos de las variables estudiadas fueron expresados en porcentajes y analizados por la Prueba de Chi-Cuadrado y el test de Correlación de Spearman, con límites de significancia de $p < 0,05$. Así mismo, se determinó la prevalencia acumulada basados en la tasa de seropositividad observada dentro de cada grupo etario (18).

RESULTADOS

No se detectaron casos agudos de dengue en las muestras analizadas ($n=35$) por aislamiento y tipificación por PCR; mientras que en el estudio de la seroprevalencia de anticuerpos IgG anti-Flavivirus en ambas poblaciones étnicas mostrado en la Tabla I, se observa que el porcentaje de seropositividad (43,1%, 62/144) para la población Yukpa fue significativamente mayor ($p < 0,0001$) con respecto a la población Barí (6,4%, 7/110). En las comunidades Yukpas estudiadas se observó una mayor seroprevalencia en Toromo; mientras que en las comunidades Barí el mayor porcentaje se ubi-

TABLA I
PREVALENCIA DE ANTICUERPOS IgG ANTI-FLAVIVIRUS EN LA POBLACIÓN YUKPA Y BARÍ
DE LA SIERRA DE PERIJÁ, ESTADO ZULIA, VENEZUELA

Población	Comunidad	N	Positivos	%
Yukpa	Aroy	54	13	24,0
	Yapotozona	30	8	26,6
	Toromo	30	22	73,3
	Sirapta	30	19	63,3
	Total	144	62*	43,1
Barí	Kayarakae	83	2	2,4
	Saimadoyi	27	5	18,5
	Total	110	7	6,4
Total		254	69	27,2

* $P < 0,0001$ con respecto a la población total Barí.

có en Saimadoyi. La prevalencia general en ambas comunidades indígenas fue 27,2%.

En la Tabla II se observa la positividad por edad y sexo en la población Yukpa, presentándose un ligero incremento en el grupo masculino de mayores a 61 años con 60% (3/5) y 66,7% (2/3) para el femenino. También se observó una elevación del porcentaje de la prevalencia para el sexo femenino (47,1%) en el grupo etario entre 0-20 años.

La Tabla III muestra la seropositividad por edad y sexo en la población Barí donde se observó un incremento del porcentaje de la prevalencia en el grupo comprendido de mayores de 61 años (32,8%); y en el masculino, en el grupo entre 41-60 años (16,8%).

En el análisis de correlación de Spearman se obtuvo que en la población Yukpa, la comunidad de Aroy mostró una asociación positiva entre la seroprevalencia y el incremento de la edad ($r = 0,4178$ y $p < 0,01$). La asociación observada en la comunidad de Toromo fue inversa para las variables prevalencia y sexo ($r = -0,3853$ y $p < 0,05$), mientras que en la población Barí no se obtuvo ningún tipo de asociación entre las variables estudiadas.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio no arrojaron evidencia de infección activa por virus dengue; no obstante demuestran inmunidad a Flavivirus en las poblaciones indígenas de la Sierra de Perijá del Estado Zulia, Venezuela. También se demuestra la existencia de una mayor prevalencia en la población Yukpa (43,1%) que en la población Barí (6,4%) que sugiere exposición continua a Flavivirus en los primeros, indicando a su vez que en las poblaciones indígenas estudiadas, las causas o factores que condicionan la exposición/transmisión en esas zonas, son diferentes.

Gubler (4) ha señalado que el dengue endémico/epidémico se desarrolla en las zonas selváticas utilizando reservorios primates y roedores, así como mosquitos vectores generalmente del género *Aedes* (*A. aegypti* o *A. albopictus*). Este ciclo selvático enzoótico que se cumple en estas áreas, permite la permanencia del virus en los períodos silentes, circunscribiendo la mayoría de las infecciones humanas, durante esos lapsos, a zonas cercanas o circunvecinas a los focos enzoóticos (19). Los límites de es-

TABLA II
DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LA SEROPOSITIVIDAD PARA FLAVIVIRUS POR EDAD Y SEXO
EN LA POBLACIÓN YUKPA DE LA SIERRA DE PERJÁ, ESTADO ZULIA, VENEZUELA

Grupo Etario (años)	Masculino				Femenino				Total						
	n	+	%	CP	IP%	n	+	%	CP	IP%	n	+	%	CP	IP%
0-20	29	8	27,6	27,6	27,6	34	16	47,1	47,1	47,1	63	24	38,1	38,1	38,1
21-40	14	8	57,1	63,8	36,2	33	11	33,3	50,9	3,8	47	19	40,4	53,1	15,0
41-60	13	6	46,2	80,5	16,7	13	8	61,5	81,1	30,2	26	14	53,8	78,4	25,2
≥ 61	5	3	60,0	92,2	11,7	3	2	66,7	93,7	12,6	8	5	62,5	91,9	13,5
Total	61	25	41,0			83	37	44,6			144	62	43,1		

n = Número de muestras. + = Positividad. % = Porcentaje de positividad. CP= Prevalencia acumulada. IP% = Incremento del porcentaje de la prevalencia.

TABLA III
DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LA SEROPOSITIVIDAD PARA FLAVIVIRUS POR EDAD Y SEXO
EN LA POBLACIÓN BARÍ DE LA SIERRA DE PERJÁ, ESTADO ZULIA, VENEZUELA

Grupo Etario (años)	Masculino				Femenino				Total						
	n	+	%	CP	IP%	n	+	%	CP	IP%	n	+	%	CP	IP%
0-20	30	2	6,7	6,7	6,7	34	1	2,9	2,9	2,9	64	3	4,7	4,7	4,7
21-40	16	2	12,5	15,8	9,1	15	0	0,0	1,6	0,0	31	2	6,5	8,9	4,2
41-60	5	1	20,0	32,6	16,8	5	0	0,0	1,6	0,0	10	1	10,0	18,0	9,1
≥ 61	2	0	0,0	32,6	0,0	3	1	33,3	34,4	32,8	5	1	20,0	34,4	16,4
Total	53	5	9,4			57	2	3,5			110	7	6,4		

n = Número de muestras. + = Positividad. % = Porcentaje de positividad. CP= Prevalencia acumulada. IP% = Incremento del porcentaje de la prevalencia.

tas áreas estarán condicionados al número y dispersión de los reservorios y vectores presentes en las mismas, variando por lo tanto en función de elementos ecológicos y ambientales que pueden propiciar un incremento de la densidad de los factores antes descritos, lo que repercutiría en un aumento proporcional en la dispersión de éstos y en una expansión del foco enzoótico. Este fenómeno elevaría el riesgo de contacto del virus con poblaciones humanas. Esta hipótesis se sustenta en los estudios epidemiológicos realizados en Costa Rica y Panamá en 1993, los cuales demostraron que a pesar de que ambos países se han visto libres de infecciones por el virus dengue durante varias décadas, pudieron detectarse casos de transmisión en las comunidades indígenas, lo que plantearía la existencia de un posible ciclo selvático en la transmisión de esta infección (20).

Los resultados del presente estudio no arrojaron evidencias que sustenten la hipótesis previa, dado que la prevalencia de títulos anti-Flavivirus, entre ellos dengue, estuvo fuertemente relacionada al nivel de urbanidad en que viven los individuos estudiados y a la cercanía de estas comunidades a los centros urbanos y a la frecuencia de los traslados de los individuos a esos centros. El aislamiento de algunas poblaciones indígenas en áreas selváticas de difícil acceso, no parece ser un factor de riesgo en la transmisión de estos virus.

La alta seroprevalencia detectada en las comunidades Yukpas puede deberse a que son una población ubicada en un área geográfica de mayor accesibilidad que la de los Barí. Además, los Yukpas han sufrido un proceso de transculturización mayor debido a su desplazamiento hacia las ciudades, lo que facilita, a su vez, el traslado de individuos víremicos de un área a otra, de los centros urbanos hacia las comunidades, confirmandose este hecho en que el porcentaje de prevalencia es directamente propor-

cional a la cercanía con centros urbanos como Machiques, el cual arrojó una incidencia de dengue de 3,4% y ocupó el noveno lugar del total de casos reportados en el Estado Zulia durante el año 2002 (21).

Otro factor importante que explicaría la presencia de dengue, entre otros Flavivirus, en estas poblaciones, es un sistema inadecuado de disposición de desechos sólidos, condición que pudiera incrementar la densidad de vectores, facilitando la transmisión de la infección (22). Es probable que también sea un factor condicionante de la presencia del vector en la región, el hecho de que muchas de sus viviendas y poblados Yukpas son del tipo de arquitectura y distribución urbana, característica importante para la presencia de *Aedes aegypti*, que se localiza generalmente dentro de las casas, en sitios sombreados (2) y donde se acumulan recipientes con almacenamiento de agua en forma inadecuada (22-24). Esta característica que relaciona los niveles de urbanidad con el incremento de la seroprevalencia parece ser, de acuerdo a los resultados de este estudio, el mayor factor predisponente en los procesos de transmisión de esta enfermedad.

En contraste, la población Barí ubicada a una mayor altitud, en una geografía selvática de difícil acceso mediante medios de transporte habituales y con una disposición de poblados en forma de viviendas aisladas cuya arquitectura, generalmente, corresponde a la típica vivienda indígena, el porcentaje de seropositividad fue del 6,4%, lo que sugiere actividad viral baja que no parece cumplir con los parámetros descritos para el ciclo selvático en otras regiones similares. Aún dentro de las diversas comunidades Barí, se observa que los poblados con mayor accesibilidad a los centros urbanos como Saimadoyi, presentaron una mayor prevalencia (18,5%) de infecciones por Flavivirus que la comunidad más aislada como es Kayarakae (2,4%).

La prevalencia de anticuerpos IgG anti-Flavivirus en la población Yukpa, mostró un incremento (por encima del 60%) en la población mayor o igual a sesenta años, en ambos sexos, no así en la población Barí donde se observó un ligero aumento en el porcentaje de seropositividad para el sexo femenino (33%) en el mismo rango de edad. Este hallazgo, podría deberse a una acumulación de anticuerpos en diversas décadas, regularmente reiniciada, aunado al hecho de que los individuos de este rango de edad, posiblemente tengan una exposición incrementada por desplazamiento a los poblados cercanos por un mayor lapso de tiempo, tal como lo sugiere Hayes y col. en Perú (19). La población menor de 20 años resultó inmune al virus en un 38,1% mientras que los Barí en un 4,7%. Estos resultados al compararlos con la falta de inmunidad antidengue reportada por Ryder en 1967 (3) en el mismo grupo etario de la población de Tucuco de la Sierra de Perijá, permiten concluir al igual que Farfán-Ale y cols. (23) en México que los Flavivirus han tenido serias implicaciones en los niños y jóvenes indígenas, especialmente en los Yukpas, Es importante destacar además, que los hallazgos para la epidemiología de los Flavivirus en estas poblaciones contrastan con la de otras arbovirosis como es la Encefalitis Equina Venezolana (EEV), en donde el mayor factor de riesgo para adquirir la infección fue la permanencia o labor en zonas selváticas (Estévez y col., datos no publicados).

Es importante enfatizar que las medidas de vigilancia y control de la infección deben llevarse a cabo tanto en la zona urbana como en la rural puesto que la transmisión existe en ambas zonas. También se debe realizar la identificación de cepas y el monitoreo de la actividad viral en vectores capturados en la zona para esclarecer el tipo de vector y el papel que juegan las especies que pudieran estar implicadas en la transmisión de la infección en estas comu-

nidades, dado que constituyen una de las medidas más efectivas para la detección temprana de casos de dengue, fiebre amarilla y otros Flavivirus y por ende de su control (2-4, 20, 23, 25).

REFERENCIAS

1. **Teruel E.** Dengue. Revisión. *Invest Clin* 1991; 32: 201-217.
2. **Organización Panamericana de la Salud.** Dengue y Dengue Hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control. *Publicación Científica* 1992; 3-22.
3. **Ryder S.** Encuesta serológica para Flavivirus en la población humana del Estado Zulia 1967. *Invest Clin* 1979; 20 (4): 229-236.
4. **Gubler D.** Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. *CAB International, New York.* 1997; 1-22.
5. **Alcalá M, Pérez M.** Experiencia en prevención de hepatitis B en comunidades indígenas Yucpa y Barí de la Sierra de Perijá. Estado Zulia. 1983 - 1994. En: Holmes R, Velásquez T, Eds. *Estado de Salud indígena: Los Yukpa.* Fundación Zumaque. Maracaibo; 1994. p 110-120.
6. **Monsalve F, Estévez J, Costa L, Salas M, Hernández M, Olaya J, Rodríguez E, Callejas D.** Seroepidemiología del virus herpes simple 2 en una población indígena Yukpa. Estado Zulia, Venezuela. *Rev Med Chile* 2001; 129:247-252.
7. **Hadler S, De Monzón M, Ponzetto A, Anzola E, Rivero D, Mondolfi A, Bracho A, Francis D, Gerber M, Thung S, Gering J, Maynard J, Popper H, Purcel R.** Delta virus infection and severe hepatitis, an epidemic in the Yukpa Indians of Venezuela. *Ann Inter Med* 1984; 100:330-344.
8. **Pujol F, Bertolotti A, Liprandi F.** Infección activa por el virus de la Hepatitis B en indígenas Barí. En: Holmes R, Scorza J, Eds. *Estado de Salud Indígena: Los Barí.* Fundación Zumaque. Maracaibo; 1994. P 116-120.
9. **Blitz de Dorfman L, Monsalve F.** Seroprevalencia del virus de Hepatitis C en la po-

- blación indígena. Sierra de Perijá. Estado Zulia. En: Holmes R, Scorza J, Eds. Estado de salud indígena: Los Barí. Fundación Zumaque. Maracaibo; 1994. P 121-127.
10. **Hinestroza J.** Nuestra vida depende de la Sierra de Perijá. 1997; Available from: <http://esf.colorado.edu/mail/elan/mar97/0058.htm>. Accedido el día 10/05/2002.
 11. **Fundación La Salle:** Aborígenes de Venezuela. Tomo I. Etnología Contemporánea. 1983; p. 335.
 12. **Oficina Central de Estadística e Informática (OCEI).** Censo Indígena de Venezuela 1992. Tomo I. Caracas 1993.
 13. **Ruddle K.** The human use of insects: examples from the Yukpa. *Biotropica* 1973; 5: 94-101.
 14. **Scorza J.** Los Barí y su relación con la Sociedad Nacional: Pauperización, Aculturación y Etnicidad. En: **Holmes R, Scorza J,** Eds. Estado de Salud Indígena: Los Barí. Fundación Zumaque. Maracaibo; 1993. P 7-26.
 15. **Lanciotti R, Calisher C, Gubler D, Chang G, Vordam V.** Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30(3): 545-551.
 16. **Igarashi A.** Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and Chikungunya viruses. *J Gen Virol* 1978; 40: 531-544.
 17. **Kuno G, Gómez Y, Gubler D.** An Elisa procedure for the diagnosis of dengue infections. *J Virol Meth* 1991; 33: 101-113.
 18. **Punda-Polic V, Tonkie M, Capkun V.** Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in the female populations of the County of Split Dalmatia Croatia. *Eur J Epidemiol* 2000; 16: 875-877.
 19. **Hayes C, Phillips I, Callahan J, Griebenow W, Hyams K, Wu S, Watts D.** The epidemiology of dengue virus infection among urban, jungle, and rural populations in the amazon rural region of Peru. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55(4): 459-463.
 20. **Organización Panamericana de la Salud.** Dengue Fever in Costa Rica y Panamá. *Epidemiological Bulletin of PAHO* 1994; 15: 9-10.
 21. **Ministerio De Salud y Desarrollo Social.** Boletín Semanal de la Unidad de Vigilancia Epidemiológica del Sistema Regional de Salud del Estado Zulia, Semana epidemiológica N° 52, 2002; 1-5 pp.
 22. **Montes T.** Actualización en Dengue Parte 1. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2001; 21(1): 39-45.
 23. **Farfán-Ale J, Loroño-Pino M.** Incidencia de infección por virus dengue en niños de 8 a 14 años de edad radicados en las áreas urbana y rural del Municipio de Mérida, Yucatán. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1991; 48(11): 780-784.
 24. **Degallier N, Vilarinhos P, de Carvalho M, Knox M, Caetano J.** People's knowledge and practice about dengue, its vectors, and control means in Brasilia (DF), Brazil: its relevance with entomological factors. *J Am Mosq Control Assoc* 2000; 16(2): 114-23.
 25. **Ryder S.** Creación de una red de vigilancia epidemiológica para dengue en Venezuela. *Invest Clin* 1983; 24 (3): 95-97.