

Sección: Artículos originales

Dengue confirmado virológica y serológicamente en Cali

Jair Astudillo Cuero, MD¹

María Teresa Restrepo de Mesa, Bact²

Luis Alberto Tafur Calderón, MD³

RESUMEN

A 19 pacientes del Centro de Atención Básica La Selva del Instituto de Seguros Sociales y a 44 personas que solicitaron exámenes de diagnóstico de dengue en el Laboratorio de Virus del Departamento de Microbiología de la Universidad del Valle, entre marzo y octubre de 1987, se les tomó muestra de sangre para aislamiento de virus y para serología. Se identificaron 29 casos de dengue, 18 de ellos por aislamiento de virus dengue 1, 2 por aislamiento de virus dengue 2, y 9 casos por seroconversión. Mostraron respuesta inmunitaria primaria

16 pacientes y secundaria 6. Otros 7 pacientes con aislamiento del virus no proporcionaron el suero convalescente que permitiera clasificar su respuesta inmunitaria como primaria o secundaria. Todos los pacientes desarrollaron los síntomas de la fiebre del dengue. Aunque 10 presentaron síntomas hemorrágicos no se observaron casos de fiebre hemorrágica del dengue ni del síndrome del shock del dengue. El aislamiento de los virus DEN-1 y DEN-2 indica la circulación simultánea de ellos en el ambiente, lo cual debe alertar a las autoridades para incrementar las medidas de control contra el mosquito *Aedes aegypti*.

El virus dengue, con cuatro serotipos reconocidos como dengue 1 a dengue 4 (DEN-1 a DEN-4) es un flavivirus transmitido por el *Aedes aegypti*¹. La infección con cualquiera de los cuatro serotipos puede originar desde infecciones subclínicas hasta síndromes severos con casos fatales. La forma benigna fiebre del dengue (FD), es dependiente de la edad. En niños pequeños puede ocurrir como enfermedad febril indiferenciada o con exantema máculopapular. En los niños mayores y en los adultos, la enfermedad generalmente se caracteriza por fiebre, cefalea, mialgia, síntomas gastrointestinales y exantema máculopapular. Se pueden observar fenómenos hemorrágicos

menores con recuento de plaquetas y hematocrito normales. Por el contrario, la forma severa de la enfermedad, fiebre hemorrágica del dengue y síndrome del shock del dengue (FHD/SSD), ocurre en dos etapas. La enfermedad comienza con síntomas similares a FD, durante o poco después de bajar la temperatura las condiciones del paciente se deterioran, la piel se enfría, el pulso es rápido y el paciente se torna letárgico, somnoliento, hipotenso y si no es tratado oportunamente puede morir entre las 4 a 6 horas siguientes. Son hallazgos constantes de laboratorio la trombocitopenia y la hemoconcentración².

Estudios experimentales en humanos han demostrado que la infección con un tipo de virus dengue origina un período de protección de 3 a 6 semanas contra la infección con otro serotipo; después de este período, la exposición a un serotipo distinto resulta en infección y probablemente en enfermedad. La primera infección con cualquier tipo de

1. Médico especialista en Medicina Familiar, Centro de Atención Básica La Selva, Instituto de Seguros Sociales, Cali, Colombia.
2. Profesora Auxiliar, Departamento de Microbiología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
3. Profesor Asistente, Departamento de Medicina Social, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

virus dengue se denomina infección primaria y las siguientes, con un tipo diferente, se denominan secundarias y las respuestas inmunitarias serán primarias y secundarias respectivamente. No ocurre reinfección por el mismo serotipo del virus³.

En las regiones tropicales y subtropicales de América continental y del Caribe, el virus dengue ha provocado epidemias por los cuatro serotipos⁴. En 1981, ocurrió la primera epidemia de FHD/SSD en el hemisferio occidental, en Cuba, con más de 350 mil casos y 159 muertes, atribuidas al DEN-2⁵. Desde 1985, han continuado ocurriendo casos esporádicos de FHD/SSD, algunos fatales, en diferentes países de Centroamérica y del Caribe, por ejemplo en Méjico, Antillas Menores⁶, Antillas Holandesas⁷, Puerto Rico⁸⁻¹², Santa Lucía, República Dominicana¹³ y en El Salvador¹⁴.

En Colombia, el *A. aegypti* fue erradicado entre 1952 y 1960, excepto de la ciudad de Cúcuta, pero la vigilancia del mosquito demostró reinfestación en 1966 en Santa Marta, extendiéndose a otras ciudades del país y dando lugar a la presentación de varias epidemias de dengue: 1971-1972 por DEN-2; 1975-1977 por DEN-3; 1977-1978 por DEN-1¹⁵, 1982, 1983 y 1984 por DEN-1 y DEN-4^{16,17} y en 1985 por DEN-1 y DEN-2¹⁸.

Durante la epidemia presentada entre 1981-1982, se hicieron ocho aislamientos de virus dengue de pacientes de Buga y Palmira, municipios del Valle del Cauca, en el Laboratorio de Virus del Departamento de Microbiología, Facultad de Salud, Universidad del Valle (LVMUV), pero la identificación del serotipo como DEN-1 se realizó en el Instituto Nacional de Salud (INS)²⁵.

Durante 1987 se observó en Cali el incremento en la consulta médica de pacientes con sintomatología aguda consistente en fiebre, escalofríos, dolores articulares, cefalea y exantema, que fue diagnosticada como dengue por la comunidad médica de la ciudad y se reflejó en el número de casos informados con ese diagnóstico, en especial en los meses de abril, mayo y junio¹⁹, en los cuales se informaron 154, 280 y 466 casos respectivamente, contra un promedio mensual de 12 casos durante 1986. Para confirmar el diagnóstico clínico uno de los autores solicitó al LVMUV la realización de las pruebas necesarias para identificar el agente causal. Se tomaron entonces muestras de sangre durante la fase aguda y la fase convalescente con el fin de aislar el virus dengue y realizar con ambos sueros pruebas serológicas y determinar seroconversión, o títulos de anticuerpos en el suero de los pacientes contra este virus. En la misma época, fueron remitidos por médicos de consulta privada o acudieron espontáneamente al

LVMUV para la realización de las mismas pruebas un grupo de pacientes con síntomas similares.

En el presente artículo se describen la metodología empleada y los signos, síntomas y hallazgos de laboratorio en los pacientes con diagnóstico comprobado de dengue por aislamiento del virus y/o seroconversión.

METODOLOGIA

Selección de pacientes. Se seleccionaron 19 pacientes que asistieron a la Consulta Externa del Centro de Atención Básica (CAB) de La Selva del Instituto de Seguros Sociales (ISS) de Cali, Colombia, entre los meses de mayo y junio de 1987, con síntomas clínicos compatibles con un diagnóstico presuntivo de dengue y 44 personas que solicitaron la realización de exámenes para el diagnóstico de dengue en el LVMUV entre los meses de marzo y octubre del mismo año. A todos los pacientes se les aplicó un formulario diseñado para la investigación de casos de dengue, formulario adaptado de un cuestionario del Centro de Control de Enfermedades, Laboratorio de San Juan, Puerto Rico, que recoge datos de identificación del paciente, lugar de residencia, tiempo entre la iniciación de los síntomas y la toma de muestras y los síntomas que presenta el paciente con respuesta de sí, no y no sabe, además de la historia de episodios previos e incapacidad por la enfermedad.

A algunos de los pacientes del ISS y a quienes consultaron al LVMUV se les solicitaron exámenes rutinarios de hemoglobina, hematocrito, recuento diferencial, observación de plaquetas en el extendido periférico y tiempo de protrombina.

Estudio virológico. Se tomaron muestras de sangre sin anticoagulante a 57 pacientes durante la fase aguda de la enfermedad (suero agudo) entre los días 0 y 8 de comienzo de los síntomas. Las muestras de la fase convalescente (suero convalescente) se tomaron a 37 pacientes entre los días 9 y 30. El suero agudo se conservó a -65° C y el suero convalescente a -20° C.

Todos los sueros agudos se inocularon en cultivos celulares para aislamiento viral. Los sueros agudos y convalescentes se probaron simultáneamente por inhibición de la hemoaglutinación para determinación de anticuerpos. Se consideraron por el laboratorio como casos de dengue, aquellos pacientes a quienes se les aisló el virus y/o a quienes se les demostró un alza de anticuerpos del suero convalescente mayor o igual a 4 veces con respecto al título de anticuerpos del suero agudo.

Línea celular para aislamiento del virus dengue. Para el aislamiento del virus dengue se utilizaron las células TRA-284 de *Toxorhynchites amboinensis* suministradas por el Laboratorio San Juan. Las células TRA-284 se subcultivaron a temperatura ambiente (25° C aproximadamente) en medio de crecimiento Leibovitz-15 (L-15) con 40% de caldo triptosa fosfato, 10% de suero fetal bovino obtenido en el LVMUV y 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina). En tubos de vidrio de 160 mm por 12.5 mm con tapón de caucho se sembraron 500.000 células en 2 ml de medio y 72 horas después se tuvo lista la monocapa celular. Se les cambió el medio de crecimiento a medio de mantenimiento con 2% de suero fetal bovino para inocular los sueros agudos y los virus control.

Virus control. Los virus prototipo DEN-1 Hawai, DEN-2 Nueva Guinea, DEN-3 H87 y la cepa de Puerto Rico DEN-4 54157 los facilitó el Laboratorio San Juan. Se inoculó 0.1 ml de cada virus en los tubos con monocapa celular de TRA-284. Las células inoculadas se incubaron a temperatura ambiente por 10 días.

Aislamiento del virus dengue a partir del suero agudo. Se inoculó 0.05 ml del suero agudo en los tubos con células TRA-284. Algunos sueros mostraron citotoxicidad aproximadamente a los 20 minutos de inoculación y por lo tanto fue necesario cambiar el medio de mantenimiento para evitar el daño celular. La incubación se hizo de igual con los virus control.

Determinación del aislamiento viral por la prueba de inmunofluorescencia directa e identificación del serotipo por inmunofluorescencia indirecta. Se utilizó el método de Gubler *et al*²⁰ para determinar los aislamientos virales con la prueba de inmunofluorescencia directa y para serotipificar con la prueba de inmunofluorescencia indirecta. En forma breve, consistió en cosechar las células inoculadas con los virus control y con los sueros agudos y distribuir las en los pozos de las láminas para inmunofluorescencia. La inmunofluorescencia directa se hizo depositando en cada pozo una gota de conjugado antiviral dengue, consistente en inmunoglobulinas humanas policlonales marcadas con isotiocianato de fluoresceína, suministrado por el Laboratorio San Juan. Se observaron las células teñidas con este conjugado, en un microscopio Nikon de epiluminación, con lámpara de mercurio OSRAM HBO-100 W, filtro excitador azul, a 400x. El patrón de fluorescencia consistió en gránulos finos o densos, citoplasmáticos o en una banda fluorescente en la membrana citoplasmática.

Se identificaron las muestras que resultaron positivas y se escogieron las correspondientes láminas preparadas para la

prueba de inmunofluorescencia indirecta para identificar el serotipo del virus aislado. Las placas preparadas para la prueba de inmunofluorescencia directa se hicieron reaccionar con anticuerpos monoclonales para cada serotipo del virus, obtenidos en el líquido ascítico de ratones Balb/c. Estos anticuerpos monoclonales fueron 15F3 (DEN-1), 3H5 (DEN-2), 5D4 (DEN-3) y 1H10 (DEN-4). Se usó como control negativo una gota de medio de cultivo para hibridomas, como control positivo, una gota de líquido ascítico inmune para DEN-2 (334371), del INS. Como conjugado se utilizó inmunoglobulina de cabra anti-ratón marcada con ISTCF (Antibodies Inc). La observación de la reacción se hizo en las mismas condiciones de prueba de inmunofluorescencia directa.

Determinación del título de anticuerpos en los sueros agudos y convalescientes por la prueba de inhibición de la hemoaglutinación. La determinación de anticuerpos en los sueros agudos y convalescientes se hizo por la microtécnica descrita en el manual de procedimientos para el diagnóstico del dengue del Centro de Control de Enfermedades del Laboratorio de San Juan²¹.

Los sueros agudos y convalescientes se trataron antes de la prueba con caolín y glóbulos rojos de ganso para eliminar inhibidores y aglutininas inespecíficas. Los sueros tratados quedaron en dilución 1:10; para titulación de anticuerpos, se hicieron diluciones dobles partiendo de 1:10. Los antígenos extraídos con sacarosa-acetona fueron: DEN-1 Hawai N° 6, DEN-2 (TR 1751) mezcla de antígenos N° 3 y 4, DEN-4 (H-241) N° 2, obtenidos en el LVMUV y el DEN-3 A-411 obtenido del INS. Se incluyeron también los antígenos de fiebre amarilla JSS N° 2 y de encefalitis equina del oeste WEE N° 3 obtenidos en el LVMUV para probar los sueros con otro flavivirus y con un alfavirus respectivamente. Se tuvo la precaución de procesar en la misma prueba los sueros pareados del mismo paciente. Todos los antígenos se usaron en concentración de 4-8 unidades hemoaglutinantes.

Como controles positivos se utilizaron los líquidos ascíticos inmunes 342406 (DEN-1), 334371 (DEN-2), 332839 (DEN-3) y 334572 (DEN-4) suministrados por el INS. Los líquidos ascíticos inmunes para los antígenos de fiebre amarilla JSS y WEE no existían en el LVMUV y por lo tanto no se incluyeron en las pruebas. Los líquidos ascíticos inmunes también fueron tratados para inhibidores y aglutininas inespecíficas.

RESULTADOS

Con base en los criterios de aislamiento viral y seroconversión, se clasificaron como casos 11 pacientes del gru-

po de 19 que habían solicitado atención médica en el ISS y 18 de las 44 personas que asistieron espontáneamente o fueron remitidos por médicos de consulta privada al LVMUV. En el resto de pacientes o no se aisló el virus, o sólo suministraron una de las dos muestras de suero agudo o convalescente y la serología no fue interpretable, o los niveles de anticuerpos en ambos sueros fueron similares es decir, se consideraron como títulos estables correspondientes a una infección antigua, o finalmente, los sueros agudo y convalescente no mostraron anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación en la dilución 1:10 y se consideraron negativos.

De 56 muestras de suero agudo se logró aislamiento viral e identificación por primera vez en el LVMUV en 20 pacientes a quienes se les había tomado la muestra hasta el día 4 después de iniciados los síntomas. Uno de estos pacientes se excluyó por no tener información relacionada con la sintomatología. Se tipificaron por inmunofluorescencia indirecta 18 aislamientos como DEN-1 y dos como DEN-2. Con el criterio de aislamiento viral y seroconversión se confirmaron 12 casos debido a que 8 de los 20 pacientes con aislamiento no proporcionaron el suero convalescente. Por sólo seroconversión se diagnosticaron 10 pacientes.

Se interpretó como respuesta inmunitaria primaria la de 16 pacientes cuyos títulos de inhibición de hemoaglutinación en el suero convalescente fueron ≤ 320 y como respuesta secundaria la de 6 pacientes con títulos >320 .

Demostraron seroconversión para los cuatro serotipos del virus dengue y para el antígeno de fiebre amarilla JSS 14 pacientes, mientras que los 8 restantes seroconvirtieron para 2 ó 3 antígenos de dengue y para fiebre amarilla. Ninguno de los sueros demostró anticuerpos para el antígeno WEE.

En el Cuadro 1 se incluyen ejemplos representativos de algunos de los aislamientos virales, títulos de anticuerpos para los diferentes antígenos e interpretación de los resultados.

Del total de 29 casos, 16 eran hombres entre los 15 y 51 años y 13 eran mujeres entre los 11 y 55 años de edad.

Con relación a los signos y síntomas, todos los pacientes refirieron fiebre, 28 de los 29 dolor en el cuerpo, 27 escalofríos y cefalea, 25 dolor en los ojos y 22 dolor articular. Otros síntomas fueron náuseas o vómito, erupción en piel, diarrea y congestión nasal. Refirieron incapacidad para trabajar o realizar sus labores habituales 12 pacientes de los 29 casos. Ningún paciente refirió sangre en la orina ni ictericia.

En el Cuadro 2 se presentan los síntomas por sexo y número total. Es de resaltar que 10 pacientes presentaron algún síntoma hemorrágico, y cuatro de ellos tuvieron dos o más síntomas hemorrágicos simultáneamente; un hombre de 38 años presentó gingivorragias y hematemesis; una mujer de la misma edad petequias y equimosis,

Cuadro 1
Resultados del Laboratorio de Virología Representativos de los Casos de Dengue

Suero	Días ^a	Aislamiento	Título anticuerpos IHA ^b				Interpretación		
			D1	D2	D3	D4	FA	WEE	
SA ^c	0	DEN-1	<10	<10	<10	<10	<10	<10	IR
SA	0	No	<10	<10	<10	<10	<10	<10	
SC ^d	20		160	80	80	80	80	<10	IRP
SA	3	No	20	80	80	40	80	<10	
SC	17		≥1280	≥1280	≥1280	≥1280	≥1280	<10	IRS
SA	4	DEN-2	<10	80	40	20	40	<10	
SC	25		640	≥1280	320	640	≥1280	<10	IRS
SA	1	DEN-1	<10	<10	<10	<10	<10	<10	
SC	32		80	80	80	40	80	<10	IRP

^a Días después del comienzo de los síntomas

^b Inhibición de hemoaglutinación

^c Suero agudo

^d Suero convalescente

IR Infección reciente

IRP Infección reciente primaria

IRS Infección reciente secundaria

Cuadro 2
Signos y Síntomas por Sexo en
Casos de Dengue

Signo o síntomas	Hombres	Mujeres	Total
Fiebre	16	13	29
Cefalea	15	12	27
Dolor ojos	13	12	25
Dolor cuerpo	15	13	28
Dolor articular	12	10	22
Erupción	6	9	15
Náusea o vómito	11	5	16
Diarrea	5	6	11
Escalofríos	15	12	2
Congestión nasal	7	5	12
Dolor garganta	8	3	11
Tos	5	0	5
Petequias	2	2	4
Equimosis	0	2	2
Hematemesis	2	1	3
Melenas	0	2	2
Epistaxis	1	1	2
Gingivorragias	2	2	4
Hematuria	0	0	0
Metrorragias	-	0	0
Ictericia	0	0	0
Incapacidad	6	6	12

una niña de 11 años gingivorragias, melenas y hematemesis y una mujer de 38 años equimosis, epistaxis, gingivorragias y melenas. Esta última tenía respuesta inmunitaria secundaria.

De 13 pacientes, a quienes se les hizo leucograma, 8 presentaron leucopenia, de estos, 3 eran mujeres con linfocitosis, y 3 pacientes con linfopenia, 2 de ellos hombres. De 9 pacientes a quienes se les informó plaquetas en el extendido periférico, uno era mujer sin síntomas hemorrágicos y las tenía ligeramente disminuidas, otra mujer con petequias y equimosis con plaquetas normales y un hombre con petequias presentó plaquetas aumentadas. El tiempo de protrombina determinado en 5 pacientes fue normal.

DISCUSION

El mosquito transmisor del dengue es el *A. aegypti*, cuyos huevos toleran la sequía por varios meses y se maduran en forma rápida cuando el recipiente donde se encuentran se llena de agua, situación generalmente asociada al inicio de la época de lluvias²². Con el fin de conocer la precipitación pluvial en Cali, en los meses previos a la presencia de los casos, se revisaron los datos registrados en las estaciones de información hidroclimatológica de la

Corporación Autónoma Regional del Cauca, los cuales demuestran que en los meses de febrero, marzo, abril y mayo de 1987 se presentó un incremento en las lluvias en Cali, con el mayor volumen en el mes de abril, lo cual favorece la hipótesis de la presencia del vector simultáneamente con los casos estudiados.

De los hallazgos de laboratorio es de resaltar, aunque no es sorprendente, la presencia simultánea de los virus DEN-1 y DEN-2 pues ya en 1982 hubo informes de la transmisión simultánea de DEN-1 y DEN-4 y posiblemente también de DEN-2 y DEN-3¹⁶. Llama también la atención que entre los 6 casos con respuesta inmunitaria secundaria sólo 1 refería un episodio previo similar, lo cual puede corresponder a la existencia de infecciones subclínicas no reconocidas por el mismo paciente.

Las reacciones de todos los sueros con los 5 antígenos de flavivirus (DEN-1,2,3,4, y fiebre amarilla) fueron heterotípicas, es decir, reaccionaron con más de uno de estos antígenos, lo cual puede ser un indicador de exposición natural o artificial (vacuna para fiebre amarilla) con alguno de estos u otros virus de este género, pues es bien conocida la reactividad cruzada entre virus de un mismo grupo, fenómeno que limita, en cierta forma, la interpretación de la serología²³.

Por lo tanto, en el estudio de las enfermedades virales, como de todas las enfermedades infecciosas, lo ideal es lograr el aislamiento del agente en especímenes obtenidos del paciente, siempre que se cuente con el laboratorio apropiado y la muestra sea obtenida durante los días 0 a 5 de iniciados los síntomas²³. Los 20 aislamientos de los 29 casos de este estudio, se lograron en muestras tomadas entre los días 0-4 de la enfermedad.

Un punto importante está relacionado con las condiciones de remisión de las muestras de sangre. Se recomienda separar el suero por centrifugación y enviarlo congelado en hielo seco o en nitrógeno líquido para garantizar la viabilidad del virus. Si existe la facilidad de un transporte rápido al laboratorio, dentro de la primera hora de tomada la muestra de sangre, ésta se puede remitir sin centrifugar y sin congelar.

Los casos estudiados correspondieron casi todos a personas adultas con excepción de una niña de 11 años de edad y fueron diagnosticados como fiebre del dengue aunque en 10 pacientes se observaron fenómenos hemorrágicos, estos síntomas no son suficientes para diagnosticar los casos como fiebre hemorrágica del dengue porque la fiebre del dengue puede estar acompañada de fenómenos hemorrágicos menores pero con hematocrito y

plaquetas normales². Aunque en este estudio no se presentaron casos de fiebre hemorrágica del dengue ni síndrome del shock del dengue, es importante sin embargo, alertar a las autoridades de salud así como a los clínicos ante la presentación de brotes futuros de dengue, ahora cuando se tiene certeza de la infección, por lo menos de una parte de la población con este virus, lo cual les ha conferido un estado inmune que potencialmente favorecería la severidad de la enfermedad durante reinfecciones si se tiene en cuenta la hipótesis de la asociación entre niveles de anticuerpos subneutralizantes y la ocurrencia de la fiebre hemorrágica del dengue y el síndrome del shock del dengue, además de la circulación simultánea de 2 ó más serotipos²⁴.

SUMMARY

Blood samples were analysed for dengue virus in 19 patients of Centro de Atención Básica, La Selva, Instituto de Seguros Sociales, and 44 people who asked virological examinations for dengue to the Virus Laboratory of Microbiology Department, Universidad del Valle. Twenty cases had classic symptoms of the illness and positive virus culture, 18 of them dengue for virus type 1 and 2 for virus type 2. Nine other had classic symptoms and seroconversion titers suggestive of dengue. Primary immunologic response in 16 and secondary 6. In 7 patients immunologic response could not be identified. Ten cases had minor hemorrhagic phenomena. Dengue hemorrhagic fever or dengue shock syndrome cases were not observed. Simultaneous presence of infections by virus type 1 and 2 indicate an increase risk of hemorrhagic dengue. *Aedes aegypti* control by sanitary authorities is urgent in Cali.

REFERENCIAS

- White, D, Fenner, F. *Medical virology*. 3 ed., Academic Press Inc, London, 1986.
- Halstead, SB. Dengue haemorrhagic fever-a public health problem and a field for research. *Bull WHO*, 1980, 58: 1-21.
- Halstead, SB. Dengue: hematologic aspects. *Semin Hematol*, 1982, 19: 116-131.
- Dengue surveillance*. Summary No. 11. San Juan Laboratories (ed). Dengue Branch, Division of Vector Borne Viral Diseases, Center for Infectious Diseases. Center for Disease Control, San Juan, Puerto Rico, April, 1983.
- Kouri, G, Mas, P, Guzmán, MG, Soler, M, Goyenechea, A & Morier, L. Dengue hemorrágico en Cuba, 1981. Diagnóstico rápido del agente etiológico. *Bol Of Sanit Panam*, 1982, 93: 414-420.
- Dengue surveillance*. Summary No. 22. San Juan Laboratories (ed). Dengue Branch, Division of Vector Borne Viral Diseases, Center for Infectious Diseases. Center for Disease Control, San Juan, Puerto Rico, February, 1985.
- Dengue surveillance*. Summary No. 23. San Juan Laboratories (ed). Dengue Branch, Division of Vector Borne Viral Diseases, Center for Infectious Diseases. Center for Disease Control, San Juan, Puerto Rico, March, 1985.
- Dengue surveillance*. Summary No. 26. San Juan Laboratories (ed). Dengue Branch, Division of Vector Borne Viral Diseases, Center for Infectious Diseases. Center for Disease Control, San Juan, Puerto Rico, September, 1985.
- Dengue surveillance*. Summary No. 29. San Juan Laboratories (ed). Dengue Branch, Division of Vector Borne Viral Diseases, Center for Infectious Diseases. Center for Disease Control, San Juan, Puerto Rico, January, 1986, 1986.
- Dengue surveillance*. Summary No. 37. San Juan Laboratories (ed). Dengue Branch, Division of Vector Borne Viral Diseases, Center for Infectious Diseases. Center for Disease Control, San Juan, Puerto Rico, September, 1986.
- Dengue surveillance*. Summary No. 39. San Juan Laboratories (ed). Dengue Branch, Division of Vector Borne Viral Diseases, Center for Infectious Diseases. Center for Disease Control, San Juan, Puerto Rico, November, 1986.
- Dengue surveillance*. Summary No. 243. San Juan Laboratories (ed). Dengue Branch, Division of Vector Borne Viral Diseases, Center for Infectious Diseases. Center for Disease Control, San Juan, Puerto Rico, June, 1986.
- Dengue surveillance*. Summary No. 38. San Juan Laboratories (ed). Dengue Branch, Division of Vector Borne Viral Diseases, Center for Infectious Diseases. Center for Disease Control, San Juan, Puerto Rico, October, 1986.
- Dengue surveillance*. Summary No. 48. San Juan Laboratories (ed). Dengue Branch, Division of Vector Borne Viral Diseases, Center for Infectious Diseases. Center for Disease Control, San Juan, Puerto Rico, November, 1987.
- Groot, H The reinvasion of Colombia by *Aedes aegypti*: aspects to remember. *Am J Trop Med Hyg*, 1980, 29: 330-338
- Dengue surveillance*. Summary No. 17. San Juan Laboratories (ed). Dengue Branch, Division of Vector Borne Viral Diseases, Center for Infectious Diseases. Center for Disease Control, San Juan, Puerto Rico, February, 1984.
- Dengue surveillance*. Summary No. 25. San Juan Laboratories (ed). Dengue Branch, Division of Vector Borne Viral Diseases, Center for Infectious Diseases. Center for Disease Control, San Juan, Puerto Rico, August, 1985.
- Dengue surveillance*. Summary No. 33. San Juan Laboratories (ed). Dengue Branch, Division of Vector Borne Viral Diseases, Center for Infectious Diseases. Center for Disease Control, San Juan, Puerto Rico, May, 1986.
- SIS-12. Secretaría de Salud de Cali, Sección de Epidemiología, 1987.
- Gubler, DJ, Kuns, G, Sather, GE, Vélez, M & Oliver, A. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg*, 1984, 33: 158-165.
- Center for Disease Control, Puerto Rico, PAHO, Washington. *Dengue Laboratory diagnostic procedures for the Americas: a manual*, 1981.
- Corporación Autónoma Regional del Cauca. *Sistema de información hidroclimatológica*. Resumen mensual multianual de precipitación total, febrero, 1988.
- Evans, AS. *Viral infections of human*. John Willey and Sons Ltd, 1978.
- Halstead, SB. The pathogenesis of dengue. Molecular epidemiology in infectious diseases. *Am J Epid*, 1981, 114: 632-648.
- Boshell, JB, Groot, H, Gachamá, MG et al. Dengue en Colombia. *Biomédica*, 1986, 6: 101-106.