

ESTUDIO SEROLÓGICO Y VIROLÓGICO DEL BROTE DE DENGUE EN LA PROVINCIA DE CORONEL PORTILLO. UCAYALI, PERÚ (2000 – 2001)

Miguel Cobos Z¹, Victoria Gutiérrez P¹, María García M¹, Enrique Mamani Z¹, Rosa Fernández C², Rocío Rimarachín D², Tomás Paredes A¹, Enrique Pérez P¹.

RESUMEN

Objetivos: identificar y determinar la circulación de los serotipos de virus dengue durante el brote producido entre los años 2000 y 2001 en la provincia de Coronel Portillo, departamento de Ucayali, Perú. **Materiales y Métodos:** Se trabajó con los casos probables de dengue que enviaron sus muestras al Instituto Nacional de Salud para su confirmación diagnóstica, se determinaron los casos de infección reciente a partir de ELISA de captura de IgM (MAC-ELISA), se realizó el aislamiento en cultivos de células y la identificación por inmunofluorescencia indirecta (IFI). **Resultados:** Se procesaron un total de 742 muestras, se obtuvo que 19,1% resultaron positivos, 75,1% indeterminados y 4,3% negativos. De las muestras positivas, 52,8% fueron mujeres y la población entre 11 a 40 años representó 66,9% de casos. Se realizaron 42 aislamientos en cultivo celular, identificando por IFI a 90,5%(38) como serotipo 3 y al restante (4) como serotipo 1. **Conclusiones:** Durante el brote de dengue ocurrido entre los años 2000 y 2001 en la provincia de Coronel Portillo circularon dengue serotipo 1 y mayoritariamente el serotipo 3.

Palabras clave: Dengue; Virus del Dengue/aislamiento & purificación; Serotipificación; Perú (Fuente: BIREME).

ABSTRACT

Objectives: To identify and determine the circulation of dengue fever virus serotypes during the 2000-2001 outbreak in Coronel Portillo province, Ucayali department, Peru. **Materials and Methods:** Probable dengue fever cases who had their blood samples sent to the Peruvian National Institutes of Health for diagnosis confirmation were studied, and recent infection cases were determined using a capture IgM ELISA test (MAC-ELISA). Viral isolation was performed using cell cultures, and identification was achieved using indirect immunofluorescence (IIF). **Results:** 742 samples were assessed, 19,1% were found to be positive, 75,1% were undetermined, and 4,3% were negative. Of the positive samples, 52,8% were from women, and 66,9% of all cases were from persons between 11 and 40 years old. 42 viral isolates were obtained in cell culture, and 90,5% (38) of them were identified as serotype 3 and IIF, and the four remaining were identified as serotype 1. **Conclusions:** During the dengue outbreak between 2000 and 2001 in Coronel Portillo province, dengue fever virus serotype 1 and mostly serotype 3 were circulating in the affected area.

Key words: Dengue, Dengue Virus/Isolation & purification ; Serotyping; Peru (source : BIREME).

INTRODUCCIÓN

El dengue es considerado como un serio problema de salud pública en muchos países de América, Asia y África; generando en ellos, una gran morbi-mortalidad en la población afectada. El desarrollo de esta enfermedad tiene macrodeterminantes, que son comunes en regiones donde el dengue es endémico o epidémico¹. El Perú no está ajeno a esta situación, y durante

los últimos 13 años se ha evidenciado un incremento del número de casos, demostrándose el ingreso progresivo de los 4 serotipos, DEN 1, DEN 2^{2,3} (variedad americana y asiática), DEN 3 y DEN 4; asimismo, se han presentando todas las manifestaciones clínicas de esta enfermedad⁴.

En nuestro país el dengue entró a inicios de la década de 1990 por la cuenca amazónica^{5,6}, la cual se ha con-

¹ Laboratorio de Arbovirus, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

² Laboratorio de Referencia Regional Ucayali, Dirección de Salud Ucayali, Yarinacocha - Pucallpa. Ucayali, Perú.

vertido en una zona altamente endémica. Actualmente, circulan los 4 serotipos de dengue en 13 departamentos: Tumbes, Piura, La Libertad, Lambayeque, Loreto, Ucayali, San Martín, Huánuco, Junín (Chanchamayo, Satipo), Cajamarca (Jaén), Pasco (Oxapampa), Madre de Dios y Amazonas (Bagua), presentándose la forma hemorrágica de la enfermedad en los departamentos de Tumbes, Piura y La Libertad⁷.

En el año 2000, a nivel nacional se reportaron 5486 casos probables de dengue en el Perú, de este modo el Instituto Nacional de Salud recibió aproximadamente 2063 muestras procedentes de los departamentos comprometidos; a partir de estas muestras se confirmaron 382 casos por serología y de estos 55 fueron confirmados por aislamientos⁸, durante el año 2001 se reportaron 23 329 casos probables de dengue, se confirmaron 1377 casos por serología y de estos 226 fueron confirmados por aislamientos⁹; por lo que actualmente se considera, al dengue en nuestro país, como un problema de importancia en salud pública, por la morbilidad que viene produciendo en áreas de transmisión^{10,11}.

En objetivo de esta investigación es identificar y determinar la circulación de los serotipos de virus dengue durante el brote producido entre los años 2000 y 2001 en la provincia de Coronel Portillo, departamento de Ucayali, Perú; mediante aislamientos en cultivos de células, su identificación por inmunofluorescencia indirecta y la determinación de casos de infección reciente a partir de ELISA de captura de IgM (MAC-ELISA).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo, retrospectivo con 742 muestras procedentes del departamento de la provincia de Coronel Portillo, departamento de Ucayali, durante el período de enero de 2000 a diciembre de 2001. Para lo cual se revisó las fichas clínico epidemiológicas de pacientes con un tiempo de enfermedad menor de 7 días, entre 5 y 65 años de edad, que acudieron a los establecimientos de salud de esta zona y cumplieron con la definición de caso probable de dengue: Fiebre mayor a 38 °C, que tenga gota gruesa negativa y además presentar dos o más de los siguientes signos o síntomas: escalofríos, cefalea, mialgia, dolor retro ocular, artralgia, rash, malestar general.

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA SEROLÓGICA

A pacientes definidos como casos probables de dengue, se les extrajo sangre por venopunción¹², obteniendo 2 alícuotas de suero en crioviales estériles de

1 mL, para realizar el aislamiento viral en las muestras de pacientes con un tiempo de enfermedad de hasta cinco días; los que tenían mas de 5 días de enfermedad, se usaron las muestras para serología.

Todas las muestras tenían las fichas clínico-epidemiológicas de los pacientes; se conservaron a -20 °C y fueron transportadas con hielo seco, desde el Laboratorio de Referencia Regional de Yarinacocha-Pucallpa al Laboratorio Referencial de Arbovirus del Instituto Nacional de Salud (INS). Se incorporaron los datos epidemiológicos mediante el uso de software PHLIS (Public Health Laboratory Information System) usado por el Sistema de Información de la Red Nacional de Laboratorios en Salud Pública.

PRUEBA ELISA DE CAPTURA DE IgM

Se trabajó en tiras y placas de fondo plano (Inmulon II®), se impregnaron con anti IgM humano desarrollado en cabra a la concentración óptima, diluido con solución tampón fosfato salino (PBS 1x) pH 7,2 y se dejaron a 4 °C hasta el día siguiente. Los sueros problemas, controles positivos y controles negativos fueron diluidos 1:40 con PBS 1x conteniendo 2% de leche descremada. Se incubó a 37 °C en una cámara húmeda por 2 horas¹³. La secuencia de lavados se realizó con PBS 1x pH 7,2 que contenía *tween* 20 al 0,05%. El antígeno usado para la prueba fue el virus DEN1 cepa Hawaii, preparado según el método «sucrosa-acetona», inactivado con b propiolactona al 0,1%. La dilución de trabajo del antígeno fue diluido con PBS 1x conteniendo leche descremada al 2% y suero humano normal (SHN) al 2%, se incorporó al sistema antígeno control negativo preparado a partir de cerebros de ratones lactantes.

Se usó conjugado antilavivirus 6b-6c unido con peroxidasa diluido 1:6000, se incubó a 37 °C en cámara húmeda por una hora, después de la secuencia de lavados con PBS 1x se agregó sustrato (10 mg OPD, 10 uL de H₂O₂, 25 mL de buffer fosfato citrato a pH 5), luego de incubar por 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente, se paró la reacción con H₂SO₄ 2N. Las placas o tiras fueron examinadas con el lector ELISA a 490 nm, se verificó la validez de la prueba, y se calculó el valor de corte para determinar la positividad o negatividad de la muestra (Figura 1).

AISLAMIENTO VIRAL

La línea celular empleada para recuperar virus fue la C6-36; las muestras fueron diluidas a 1:20 e inocula-

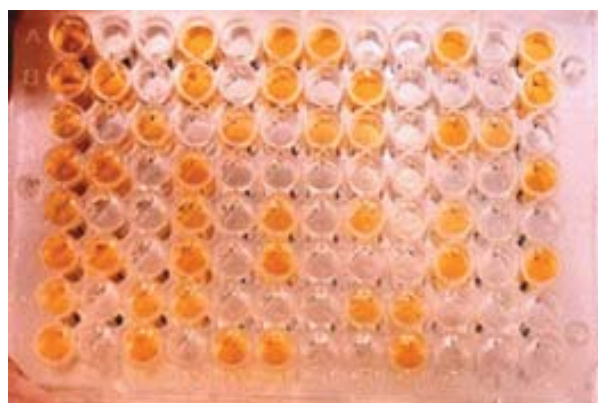


Figura 1. Prueba de captura de MAC ELISA.

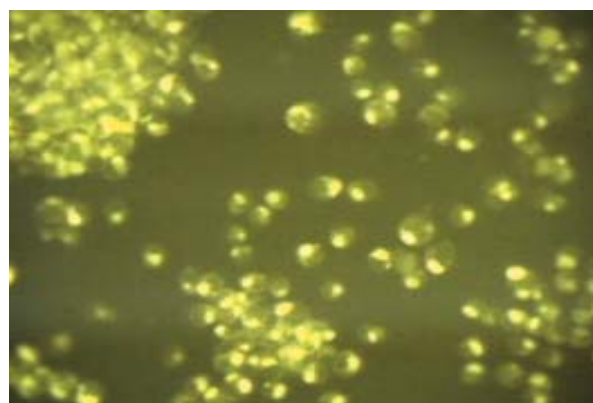


Figura 2. Tipificación del virus dengue por IFI

das en tubos 16 x 125 que contenían la monocapa celular confluyente, en un volumen de 100 µL por muestra, se expuso entre 30 a 60 minutos para la absorción virus-célula, posteriormente se agregó 1 mL de medio de mantenimiento y se incubó a 28 °C. Fueron observados hasta por 20 días, se realizó un pasaje celular, las muestras que presentaron efecto citopático (ECP), se impregnaron en láminas para inmunofluorescencia, luego de fijadas con acetona fría, se guardaron a -70 °C hasta proceder a su tipificación por inmunofluorescencia indirecta (IFI).

TIPIFICACIÓN

Se contó con anticuerpos policlonales antiggrupo a arbovirus A, B y C y anticuerpos monoclonales específico a DEN 1, DEN 2, DEN 3 y DEN 4, procediendo a agregar en las cavidades correspondientes según protocolo e incubarlos a 37 °C en cámara húmeda por una hora, después del proceso de lavado con PBS 1x pH 7,2 se agregó conjugado anti ratón con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en una dilución adecuada, la cual contenía azul de Evans y se incubó a 37 °C en cámara húmeda una hora, después del proceso de lavado y secado se montó con solución glicerina

tamponada. Para efecto de la lectura se usó el microscopio de inmunofluorescencia Leitz (Figura 2).

RESULTADOS

En el año 2000 se recibieron en el INS 320 muestras de casos probables de dengue provenientes del departamento de Ucayali, representando 5,8% del total de casos probables informados a nivel nacional (5486); en el año 2001, Ucayali aportó 2,9% del total de los 23 329 casos probables de dengue informados en el Perú. Se enviaron 742 muestras de casos probables de dengue provenientes de Ucayali para estudio serológico, las cuales procedían de dos distritos de la provincia de Coronel Portillo: Pucallpa y Yarinacocha, que aportaron en ambos años 142 y 600 casos respectivamente.

Como resultado del estudio serológico mediante la prueba de ELISA de captura de IgM a virus dengue, se obtuvo que el 19,1% resultaron positivos, 75,1% indeterminados y el 4,3% negativos. No se realizó la prueba en el 1,5% de las muestras por estar en mal estado (Tabla 1).

Tabla 1. Muestras estudiadas por serología procedentes de la provincia de Coronel Portillo. Ucayali, Perú. 2000-2001.

	2000		2001		Total
	Pucallpa	Yarinacocha	Pucallpa	Yarinacocha	
Negativo	5	1	9	17	32
Indeterminado*	18	121	81	337	557
Positivo	7	23	13	99	142
No se realizó	3	1	6	1	11
TOTAL	33	146	109	454	742

* Muestra sérica que no reporta seroconversión por haber sido obtenida en un momento que no se evidencia presencia de anticuerpos.

Tabla 2. Muestras positivas a dengue por edad y sexo. Provincia de Coronel Portillo. Ucayali, Perú. 2000-2001.

Edad	Positivos IgM		Total
	Masculino	Femenino	
0 – 10 años	9 / 69	11 / 55	20 / 124
11 – 20 años	12 / 79	22 / 93	34 / 172
21 – 30 años	11 / 82	18 / 81	29 / 163
31 – 40 años	15 / 81	17 / 68	32 / 149
41 años o más	20 / 78	7 / 57	27 / 135
TOTAL	67 / 389	75 / 354	142 / 742

Se pudo observar que 52,8% fueron mujeres y la población entre 11 a 40 años representó 66,9% del total de muestras positivas de los casos de dengue procedentes de la provincia de Coronel Portillo (Tabla 2).

Del total de las 742 muestras para el estudio serológico, se realizó el aislamiento viral con su respectiva tipificación en 5,7%(42 muestras) que representa 29,6% del total de casos positivos según el MAC ELISA para IgM, se identificaron al 90,5% de los aislamientos como serotipo 3 y al restante como serotipo 1, no encontrándose los serotipos 2 y 4 entre las muestras estudiadas (Tabla 3).

Se pudo observar mediante el aislamiento viral en cultivo celular, el efecto citopático característico en las células C6-36 fue la formación de sincitios, inclusiones citoplasmáticas o células agrandadas y esto ocurrió en un promedio de 7 días (Figura 3).

Tomando sólo las 142 muestras positivas, 29,6% reportó haber sido vacunado contra la fiebre amarilla, 45,8% lo ignora y 24,5% no se ha vacunado. Asimismo, sólo 5,6% de los casos presentó como antecedente un episodio previo de dengue, 31% no tuvo anteriormente dengue y 63,4% lo ignora (Tabla 4).

DISCUSIÓN

En estudios serológicos realizados en el año 1965 en la región amazónica se observó indirectamente que la

Tabla 3. Muestras para el aislamiento procedentes de la provincia de Coronel Portillo. Ucayali, Perú 2000-2001.

	Dengue 1	Dengue 2	Dengue 3	Dengue 4	Total
Pucallpa	1	0	0	0	1
Yarinacocha	3	0	38	0	41
TOTAL	4	0	38	0	42

población tenía experiencia inmunológica a los siguientes arbovirus: virus de la encefalitis equina de este (EEE), virus Mayaro (MAY), virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), virus de la encefalitis equina de San Luis (SLE), virus de la fiebre amarilla (YF), virus Caraparu (CAR), virus Murutucu (MUR), virus Guaroa (GUA) y virus Maguari y ocasionalmente virus Bussuquara¹⁴. Los antecedentes de los primeros aislamientos de arbovirosis en el Perú fueron realizados en la región amazónica usando cricetos centinelas, aislándose virus de encefalitis equina venezolana, virus Caraparu-Ossa, Marituba, Oriboca-Itaqui y los del grupo Guama Bimiti¹⁵.

La aparición de los primeros casos de dengue documentado en Iquitos (Loreto) en enero-febrero del año 1990, y las primeras detecciones fueron diagnosticadas clínicamente, las técnicas para el diagnóstico laboratorial con las que se contaba eran la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IHA), ELISA indirecta (detección de anticuerpos totales), e inoculación en sistemas de cultivos celulares (C6-36 Y VERO) y ratones lactantes (aislamiento viral). La población hacía en su mayoría una infección primaria, que se caracterizaban por cefalea, fiebre, artralgias, mialgias, dolor retrocular, no se observó ningún caso que presentara dengue hemorrágico (FDH), ni síndrome del dengue con choque (SDC); se calcula que hubo 9623 casos clínicos comprometiendo a los departamentos de San Martín y Ucayali¹⁶; posteriormente se comprobó por aislamiento viral circulación del virus dengue serotipo 1 y 4 (DEN-1, DEN-4)¹⁷. En ese año se trabajó un documento normativo del Ministerio de Salud donde se daban las pautas generales de definición de caso, caso probable y caso confirmado de dengue¹⁸.

Desde agosto de 1991 a diciembre de 1992 el *US Naval Medical Research Institute Detachment* (NAMRID) de Lima, Perú, colectó 324 muestras séricas de todos los pacientes febriles que acudieron al Programa de Erradicación del Dengue en la Región Loreto,

Tabla 4. Casos positivos a dengue con antecedentes de vacunación a fiebre amarilla y a episodio previo de dengue, procedentes de la provincia de Coronel Portillo. Ucayali, Perú 2000-2001.

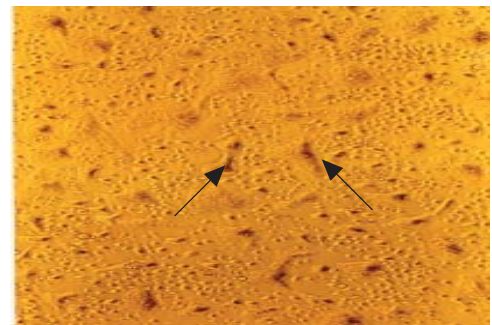
Antecedente	Positivo	Negativo	Se ignora	Total
Vacunado a fiebre amarilla	42	35	65	142
Episodio previo de dengue	8	44	90	142



Células C6-36 sin inocular muestra sospechosa a dengue.



Células C6-36 inoculadas con muestra sospechosa a dengue.



Células C6-36 donde se observa el efecto citopático.

Figura 4. Aislamiento del virus dengue en células C6-36 (Cortesía del Programa de Enfermedades Virales/Laboratorio de Virología / NMRCD, Lima)

de los cuales se obtuvieron 77 (23%) aislamientos de virus dengue serotipo 1 y además de 6 (7,2%) aislamientos de virus Oropouche¹⁹.

Desde estas primeras epidemias documentadas de dengue, se observó que los signos y síntomas predominantes eran: fiebre en 100%, dolores óseos y musculares en 100%, cefalea en 61%, dolor ocular 29%, rash dérmico 15% y síntomas gastro intestinal 10%. Así mismo, éstas han ocurrido paralela o posteriormente a epidemias como rubéola, encefalitis equina venezolana e influenza, dando lugar un falso número de casos totales de dengue²⁰⁻²³.

En el año 1995, se introdujo otro serotipo de virus dengue en el Perú, el serotipo 2; detectado en la costa norte del Perú, en Tumbes²⁴; ocasionando en ese año, brotes en Tumbes, Piura, Jaén e Iquitos; así mismo, se detectaron brotes de dengue 1 en Tingo María, La Merced y Jaén, lo que ubicó al país en un riesgo de aparición de dengue hemorrágico²⁵. Además se aisló en Piura dengue 2, a partir de muestras de pacientes en fase aguda de la enfermedad usando el sistema

de cultivo celular C6-36, de igual manera que a inicios de 1996, en Bagua Grande (Amazonas).

En el año de 1997, apareció un brote epidémico de dengue clásico en la localidad de Máncora (Piura), el Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud caracterizó molecularmente la secuencia parcial del gen de la glicoproteína NS1 del virus dengue 1, donde se concluye realizar comparaciones filogenéticas entre diferentes aislamientos peruanos a través del tiempo para determinar si un mismo genotipo de virus dengue 1 se encuentra circulando o si existe, o están apareciendo nuevos genotipos^{27,28}.

El virus dengue serotipo 3 se detectó en el año 2000 en Tumbes y Piura por primera vez y se aisló en cultivos celulares de muestras de pacientes en fase aguda de la enfermedad²⁹.

La epidemia en las ciudades de Pucallpa y Yarinacocha en el departamento de Ucayali en los años 2000 y 2001 fueron ocasionados inicialmente por dengue

serotipo 1 y luego por dengue serotipo 3. El DEN 1 probablemente recirculó y se ha hecho endémico en estas ciudades; y es posible que el DEN 3, sea el causante de otros brotes epidémicos en ciudades con las que existe una comunicación estrecha, debido al comercio, migraciones poblacionales y otros mecanismos de transmisión, por lo que es necesario realizar un estudio de genotipificación con los aislamientos obtenidos en estas ciudades, comparándolos con aislamientos obtenidos en otras áreas del país a fin de conocer su distribución.

El transporte de la muestras en fase aguda en contenedores de hielo seco fue una buena opción para aislar los serotipos de virus dengue; tal como se utilizó en otros estudios en la India.³⁰

El 74,2% del total de muestras enviadas para diagnóstico serológico fueron declaradas como indeterminadas, por lo que era necesario para poder tener la confirmación diagnóstica, una segunda muestra, pues es probable que ese resultado se deba a que la toma de la muestra fue en un tiempo en el que todavía no se hubieron formado anticuerpos; sin embargo, en ninguna de ellas se pudo obtener, debido a la no ubicación del paciente u otros motivos y por lo tanto se quedaron con la incógnita de ser confirmada por serología.

Debido a la cantidad de muestras con resultado indeterminado, se hace necesario contar con un plan estratégico dentro del sistema de salud, a fin de garantizar la obtención de la segunda muestra y lograr la confirmación del caso por serología, para conocer la magnitud del problema y se pueda tener la mejor decisión en las acciones de salud pública.

Así mismo, se pudo observar que no existe uniformidad en el llenado de las fichas epidemiológicas, por lo que es común apreciar carencia de datos, omisiones de información de exámenes clínicos preliminares; aspectos antes evidenciados por Mostorino *et al.*³¹ Asimismo, es necesario un registro oportuno mediante un sistema único e integrado de software que permita una fluida información bidireccional, sobre antecedentes de vacunaciones y si es reincidente a la enfermedad y otros datos epidemiológicos.

Se ha podido observar que del total de muestras negativas en el estudio serológico 32/732 correspondieron a otras etiologías como el de Influenza (Conversación personal Laboratorio Virus Respiratorio, CNSP-INS-Lima, Perú).

De los 142 muestras positivas a dengue, con antecedentes de vacunación a fiebre amarilla o de haber

estado anteriormente con dengue por otro serotipo, se constituye la presunción que se tratarían, en algunos casos, de infecciones secundarias, ya que en una infección primaria se obtienen densidades ópticas de lecturas de IgM con valores mínimos positivos (densidades ópticas bajas) y en las infecciones secundarias, las densidades ópticas de lectura de la IgM son elevadas y se forman en menor tiempo en la fase de convalecencia³², esto es más evidenciable cuando se tienen muestras pareadas de un mismo paciente (una muestra obtenida en la fase inicial de la enfermedad y la segunda muestra tomada 10 días después de haber obtenido la primera como mínimo). Es preocupante que la falta de datos en las fichas epidemiológicas haga suponer que se requiere un estudio de control de calidad de datos remitidos por las diferentes establecimientos de salud, e inclusive a diferentes enfermedades transmisibles.

En conclusión, durante el brote de dengue ocurrido entre los años 2000 y 2001 en la provincia de Coronel Portillo circularon dengue serotipo 1 y mayoritariamente el serotipo 3.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Guzmán M, Kouri G, Pelegrino J.** Enfermedades virales emergentes. Rev Cubana Med Trop 2001; 53 (1): 5-15.
2. **Gubler D.** Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. Emerg Infect Dis 1998; 4(3): 442-50.
3. **Isturiz R, Gubler D, Brea del Castillo J.** Dengue and dengue hemorrhagic fever in Latin America and the Caribbean. Infect Dis Clin North Am 2000; 14(1): 121-20.
4. **Santillán O, Gonzáles P.** Características clínicas y demográficas de pacientes con dengue. Hospital Regional de Pucallpa, Ucayali. En: Libro de resúmenes del VII Congreso Peruano de Enfermedades Infecciosas y Tropicales. Lima: Sociedad Peruana de Enfermedades Infecciosas y Tropicales; 2001.
5. **Gutiérrez V, García P.** Confirmación de dengue en el Perú. Período 1990 – octubre 1997. Bol Inst Nac Salud(Perú) 1997; 3(5): 7-8.
6. **Hayes C, Phillips I, Callahan J, Griebenow W, Hyams K, Wu S, et al.** The epidemiology of dengue virus infection among urban, jungle, and rural populations in the amazon region of Peru. Am J Trop Med Hyg 1996; 55(4): 459-63.
7. **Mostorino R.** Dengue: Una enfermedad reemergente en el Perú. Bol Inst Nac Salud (Perú) 2001; 7(1): 7-8.
8. **Pan American Health Organization.** (en línea) Washington Number of reported cases of dengue and dengue hemorrhagic fever (DHF), region of the Americas (by country and subregion) [actualizado en febrero 2002; fecha de acceso febrero de 2002]. Disponible en: <http://>

- /www.paho.org/English/AD/DPC/CD/dengue-cases-2000.html
9. **Pan American Health Organization.** (en línea) Washington Number of reported cases of dengue and dengue hemorrhagic fever (DHF), region of the Americas (by country and subregion) [actualizado en enero de 2002; fecha de acceso enero de 2002]. Disponible en: <http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/dengue-cases-2001.html>
 10. **Organización Panamericana de la Salud.** Taller Subregional de Evaluación del Plan Continental de Ampliación e Intensificación del Combate al *Aedes aegypti*. Países Andinos, Aruba y Cuba. Caracas: OPS/HCP/HCT/126/98; 1998. p. 35.
 11. **Perú, Dirección de Salud de Ucayali.** Guía de Vigilancia Epidemiológica del Dengue. Ucayali: DISA Ucayali; 1996.
 12. **Instituto Nacional de Salud.** Manual de procedimientos de laboratorio para la obtención y envío de muestras (I). Lima: Instituto Nacional de Salud; 1995. Serie de Normas Técnicas N° 15.
 13. **Instituto Nacional de Salud.** Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico arbovirosis. Lima: Instituto Nacional de Salud; 1996. Norma Técnica N° 16.
 14. **Buckley S, Davis J, Madanlengoitia J, Flores W, Casals J.** Arbovirus neutralization tests with Peruvian sera in Vero cell cultures. Bull World Health Organ 1972; 46(4): 451-55.
 15. **Scherer W, Madalengoitia J, Flores W, Acosta M.** The first isolations of eastern encephalitis, group C, and Guama group arboviruses from the Peruvian Amazon region of western South America. Bull Pan Am Health Organ 1975; 9(1): 19-26.
 16. **García M, Cabezas C, Leopoldo L, Acosta R.** Determinación de anticuerpos IgM contra virus dengue a partir de sangre absorbida en papel filtro: Un método alternativo y sencillo. Rev Med Exp 2000; 17(1-4): 21-25.
 17. **Phillips I, Need J, Escamilla J, Colán E, Sánchez S, Rodríguez M, et al.** First documented outbreak of dengue in the Peruvian Amazon region. Bull Pan Am Health Organ 1992; 26(3): 201-7.
 18. **Perú, Ministerio de Salud.** Norma técnica de procedimientos para el diagnóstico del dengue. Lima: MINSA; 1991.
 19. **Colán E.** Fiebre Oropuche en la Amazonía peruana. Bol Soc Peru Epidemiol Infect Trop 1995; 4(1): 17-18.
 20. **Laguna V.** Encefalitis Equina Venezolana. Lima: Ministerio de Salud/Oficina General de Epidemiología; 2000.
 21. **Torres Y, Falconí E.** Tipificación de virus influenza. En: II Congreso de Red Nacional de Laboratorios en Salud Pública. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2000.
 22. **Torres Y.** Vigilancia de la Influenza en el Perú – 2001. Bol Inst Nac Salud (Perú) 2001; 7(6): 6-9.
 23. **Mamani E, Gutiérrez V.** Fiebre Oropuche asociada a un brote de dengue clásico en Bagua 2000. En: II Congreso de Red Nacional de Laboratorios en Salud Pública. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2000.
 24. **Instituto Nacional de Salud.** Reporte de casos confirmados de enfermedades infecciosas. Bol Inst Nac Salud (Perú) 2001; 7(1): 15-18.
 25. **Perú, Ministerio de Salud.** Dengue clásico y dengue hemorrágico. Lima: OGE, INS; 2000. Módulos Técnico N° 7.
 26. **Nolasco O.** Diagnóstico temprano en un brote epidémico del virus dengue en Piura usando RT-PCR y NESTED-PCR. Rev Med Exp 1997; 14(2): 13-17.
 27. **Perú, Instituto Nacional de Salud.** Resumen Estadístico del CNLSP de la confirmación por laboratorio. Dengue. Bol Inst Nac Salud (Perú); 1996, 2 (1): 10.
 28. **Perú, Instituto Nacional de Salud.** Resumen Estadístico del CNLSP de la confirmación por laboratorio. Dengue. Bol Inst Nac Salud (Perú); 1996, 2 (2): 10.
 29. **Yabar C.** Caracterización molecular de la secuencia parcial del gen de la glicoproteína NS1 del virus dengue 1 proveniente de Máncora, Perú. Rev Med Exp 17(1-4): 35-38.
 30. **Vajpayee M, Mohankumar K, Wali J, Dar L, Seth P, Broor S.** Dengue virus infection during post-epidemic period in Delhi, India. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1999; 30(3): 597-10.
 31. **Mostorino R, Rosas A, Gutiérrez V, Anaya E, Cobos M, García M.** Manifestaciones clínicas y distribución geográfica de los serotipos del dengue en el Perú – año 2001. Rev Peru Med Exp Salud Publica 2002; 19(4): 171-80.
 32. **Schwartz E, Mileguir F, Grossman Z, Mendelson E.** Evaluation of ELISA-based sero-diagnosis of dengue fever in travelers. J Clin Virol. 2000 Dec;19(3):169-73.

Correspondencia: Miguel Cobos Zelada. Laboratorio de Arbovirus, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

Dirección: Cápac Yupanqui 1400. Lima 11, Perú.

Teléfono: (511) 471-9920

Correo electrónico: mcobos@ins.gob.pe