



Revista de Saúde Pública

ISSN: 0034-8910

revsp@usp.br

Universidade de São Paulo

Brasil

Dias Zeidler, Julianna; Amézaga Acosta, Pablo Oscar; Pereira Barrêto, Priscila; da Silva Cordeiro, Joel

Vírus dengue em larvas de Aedes aegypti e sua dinâmica de infestação, Roraima, Brasil

Revista de Saúde Pública, vol. 42, núm. 6, diciembre, 2008, pp. 986-991

Universidade de São Paulo

São Paulo, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67240171002>

- ▶ [Como citar este artigo](#)
- ▶ [Número completo](#)
- ▶ [Mais artigos](#)
- ▶ [Home da revista no Redalyc](#)

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Julianna Dias Zeidler
Pablo Oscar Amézaga Acosta
Priscila Pereira Barrêto
Joel da Silva Cordeiro

Vírus dengue em larvas de *Aedes aegypti* e sua dinâmica de infestação, Roraima, Brasil

Dengue virus in *Aedes aegypti* larvae and infestation dynamics in Roraima, Brazil

RESUMO

OBJETIVO: Identificar a presença do vírus dengue em formas larvais de *Aedes aegypti* e relacionar a presença do vetor com índice pluviométrico e número de casos de dengue.

MÉTODOS: Dezoito domicílios foram selecionados aleatoriamente para coleta de ovos em um bairro da cidade de Boa Vista (RR). Foram instaladas duas ovitrampas por domicílio e removidas após uma semana, mensalmente, de novembro de 2006 a maio de 2007. Foram calculados o índice de positividade de ovitrampa e o índice de densidade dos ovos. Após eclosão de 1.422 ovos coletados, foram formados 44 pools de no máximo 30 larvas para teste de presença do vírus dengue por meio de RT-PCR e *hemi-nested* PCR. O índice de incidência de dengue no período foi correlacionado com a precipitação pluvial. A associação entre essas variáveis e número de ovos coletados foi analisada pelo coeficiente de Pearson.

RESULTADOS: Nenhum dos pools apresentou positividade para o vírus dengue, apesar do bairro ter apresentado elevados índices de incidência de dengue no período estudado. A densidade da população de *Ae. aegypti* aumentou conforme a pluviosidade, mas não apresentou correlação com índices de incidência de casos de dengue.

CONCLUSÕES: Os resultados sugerem que a transmissão transovariana do vírus em mosquitos ocorre a uma freqüência muito baixa e por isso sua persistência em meio urbano pode não depender desse fenômeno. A população do mosquito aumentou no período de chuvas devido à formação de criadouros; a não-correlação com o índice de incidência de dengue deve-se à possibilidade desse dado ser subestimado em períodos de epidemia.

DESCRITORES: Dengue, transmissão. *Aedes*. Insetos Vetores. Entomologia. Vigilância Epidemiológica.

Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de Roraima. Boa Vista, RR, Brasil

Correspondência | Correspondence:

Julianna Dias Zeidler
Av. Cap. Ene Garcez, nº 2413 Bloco 4
Campus Paricarana - Bairro Aeroporto
69304-000 Boa Vista, RR, Brasil
E-mail: interlhma@yahoo.com.br

Recebido: 22/8/2007

Revisado: 19/5/2008

Aprovado: 2/6/2008

ABSTRACT

OBJECTIVE: To detect the presence of dengue virus in larval forms of *Aedes aegypti* and to associate vector presence with rainfall and incidence of disease.

METHODS: Eighteen households were randomly selected for egg collection in a neighborhood of the city of Boa Vista, Roraima, in Northern Brazil. Two oviposition traps were installed per home, and removed after one week. This was repeated on a monthly basis between November 2006 and May 2007. Trap positivity rate and egg density were calculated. Following the eclosion of 1,422 eggs, 44 pools of at least 30 larvae each were formed, which were evaluated for presence of dengue virus using RT-PCR and hemi-nested PCR. Dengue incidence rates in the period were correlated with rainfall rates. The association between these two variables and the number of eggs collected was determined using Pearson correlation.

RESULTS: None of the pools tested positive for presence of dengue virus, despite the high incidence of dengue in the neighborhood during the studied period. The density of *Ae. aegypti* increased with rainfall, but was not correlated with incidence of dengue.

CONCLUSIONS: The results suggest that transovarial transmission of dengue virus in mosquitoes occurs at a very low frequency, and therefore virus persistence in urban settings may not depend on such transmission. The mosquito population increased during the rainy season due to increased formation of breeding sites; the lack of correlation with incidence of dengue may be due to underestimation of incidence data during epidemics.

DESCRIPTORS: Dengue, transmission. *Aedes*. Insect Vectors. Entomology. Epidemiologic Surveillance.

INTRODUÇÃO

A primeira epidemia de dengue no Brasil com confirmação laboratorial ocorreu em Boa Vista (RR) entre 1981-1982, na ocasião foram isolados os sorotipos 1 e 4. A partir de 1982 foi desencadeada uma campanha intensiva de combate ao vetor, erradicando-o e não se reportando epidemia até 1999. Desde então os índices de incidência estiveram entre os maiores do País, com circulação dos sorotipos 2, 1 e 3, o que caracteriza o estado como hiperendêmico, uma condição crítica para a ocorrência de febre hemorrágica do dengue/síndrome do choque do dengue (FHD/SCD).⁴ Roraima faz fronteira com Guiana (a nordeste) e Venezuela (a noroeste), sendo considerado uma possível porta de entrada para novos sorotipos e genótipos de dengue no Brasil. De acordo com dados da Organização Pan-Americana de Saúde, atualmente circulam os quatro sorotipos de dengue na Venezuela, por onde pode ocorrer a reintrodução do sorotipo 4.

Na ausência de reservatórios silvestres, uma questão que se apresenta é como o vírus dengue persiste na natureza em períodos interepidêmicos, quando existem

poucos indivíduos infectados e a densidade populacional do vetor é baixa. Sugere-se que a transmissão transovariana do vírus em mosquitos contribua para sua persistência,¹⁶ uma vez que os ovos podem resistir no ambiente em condições adversas por mais de um ano. Embora esse fenômeno tenha sido relatado tanto em laboratório quanto em campo, sua importância para a persistência do vírus na natureza não foi completamente estabelecida.¹⁸

A detecção e sorotipagem do vírus do dengue por transcrição reversa seguida por reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), em amostras clínicas e mosquitos vetores vem se mostrando uma poderosa ferramenta na vigilância de epidemias.^{1,10,17} A presença de vírus em mosquitos coletados em campo permite sua detecção de seis a oito semanas antes do início da epidemia.^{1,17}

O presente estudo teve por objetivo identificar a presença do vírus dengue em larvas de *Aedes aegypti* e relacionar a presença do vetor com índice pluviométrico e número de casos de dengue no período estudado.

MÉTODOS

Boa Vista, capital de Roraima, está localizada no Hemisfério Norte ($02^{\circ}49'11''N$, $60^{\circ}40'24''W$). O bairro Mecejana foi o escolhido por ter apresentado elevado índice de incidência de dengue e índice de infestação predial (percentual de imóveis positivos para *Ae. aegypti*) no primeiro semestre de 2006, de acordo com dados da Secretaria de Saúde do Estado de Roraima e do Município de Boa Vista.^a

Ovitrampas (armadilhas de oviposição) foram instaladas mensalmente de novembro de 2006 a maio de 2007, visando a abranger estação seca (dezembro de 2006 a março de 2007) e chuvosa (novembro de 2006 e abril a maio de 2007). Sabe-se que o diâmetro aproximado de vôo do *Ae. aegypti* em meio urbano é de 800 m ao redor do criadouro onde nasceu.¹² Dezoito casas distribuídas pelo bairro foram selecionadas aleatoriamente, de forma a distarem entre si em média 360 m, não ultrapassando mais do que 600 m (entre os pontos vizinhos), cobrindo toda a extensão do bairro.

Para inferir sobre a infestação vetorial, foram calculados dois índices relativos ao ovo: o índice de positividade de ovitrampa (IPO), definido como porcentagem de armadilhas positivas; e o índice de densidade dos ovos (IDO), sendo o número médio de ovos por armadilha positiva. O IPO traduz a distribuição espacial da infestação em uma localidade, enquanto o IDO indica os períodos de maior ou menor reprodução de fêmeas de mosquitos.

A taxa mínima de infecção (TMI) foi definida pela presença do vírus dengue em *pools* de larvas, calculada como número de testes positivos dividido pelo número total de larvas e multiplicado por 1.000.

Os ovos de mosquitos foram contados nas palhetas e postos para eclosão. As larvas foram criadas até o quarto estádio e identificadas segundo a chave dicotômica de Consoli & Lourenço-de-Oliveira.² Em seguida foram lavadas por duas vezes em água deionizada e separadas de acordo com o mês e local de coleta em *pools* de no máximo 30 indivíduos e congeladas ainda vivas a -20°C. Dos 1.422 ovos coletados, 767 (60,7%) chegaram ao terceiro e quarto estádio larval e foram separadas em 44 *pools* (1.172 larvas).

Os *pools* de larvas foram macerados com micropistilo, areia autoclavada e 1 ml de meio L-15 em microtubo de 1,5 ml e posteriormente centrifugados a 8000 g por 10 min. O sobrenadante foi submetido à extração de RNA e testado para a presença do vírus dengue por RT-PCR e *hemi-nested* PCR. De igual forma, a cada extração de RNA de amostras teste, foi também realizada extração de controle positivo (sobrenadante de cultura de células infectadas com vírus dengue). Para se certificar que

não há inibição de compostos orgânicos das larvas em reações moleculares, dez larvas de *Ae. aegypti* em quarto estádio, obtidas a partir de ovos coletados em ovitrampas, foram maceradas com micropistilo, areia autoclavada e 330 µl do sobrenadante de cultura de células infectadas com dengue e submetido ao mesmo procedimento do grupo teste. A banda de 511 pb apareceu após o PCR e, após o *hemi-nested* PCR foi possível visualizar a banda de 119 pb, característica de dengue 2. Além disso, para cada grupo de amostra foi também utilizado um controle padrão de amplicon de VDEN-2 diluído 1:100 na PCR e *hemi-nested* PCR. A extração de RNA foi realizada com o reagente TRIzol®, de acordo com as recomendações do fabricante.

A RT-PCR e *hemi-nested* PCR foram executadas utilizando-se os *primers* descritos por Lanciotti et al.⁹ Na transcrição reversa foi utilizado o primer D2 e na PCR os primers D1 e D2 que amplificam um fragmento de 511 pb, localizado na confluência entre o gene C e prM. A *hemi-nested* PCR foi realizada com o primer D1 em conjunto com os primers TS1, TS2, TS3 e D4, os quais amplificam fragmentos de 482 pb, 119 pb, 290 pb e 392 pb, que caracterizam os sorotipos 1, 2, 3 e 4 do vírus dengue, respectivamente.

O índice de incidência de dengue (número de casos por 100.000 habitantes) de casos notificados e confirmados (por sorologia) da cidade foram calculados de acordo com os dados fornecidos pela Secretaria de Saúde do Estado e Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). O índice de precipitação pluvial mensal da cidade foi fornecido pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). A associação entre essas variáveis e número de ovos coletados foi analisada pelo coeficiente de Pearson (ρ), utilizando esta função em planilha eletrônica.

RESULTADOS

Os 1.422 ovos coletados apresentaram distribuição de freqüência diferente em cada período. A Tabela 1 apresenta os valores mensais para o IPO e o IDO.

Os coeficientes de correlação entre as variáveis testadas constam da Tabela 2. A maior correlação obtida foi entre índice de incidência de casos notificados e confirmados (+0,98), o que era esperado, uma vez que eles devem se comportar da mesma forma por se tratar de um mesmo tipo de dado. O número de ovos apresentou correlação positiva de +0,91 com o índice pluviométrico, sugerindo que o aumento das chuvas tenha contribuído para o aumento da população de *Ae. aegypti*. Apesar de ter apresentado baixa correlação, o número de ovos e precipitação apresentaram correlação negativa (em torno de -0,57) com os índices de incidência de dengue.

^a Coordenação de Entomologia e Setor de Epidemiologia da Secretaria de Saúde do Estado de Roraima. Dados não publicados.

Tabela 1. Índice de positividade da ovitrampa e índice de densidade de ovos de *Ae. aegypti*. Boa Vista, RR, novembro de 2006 a maio de 2007.

Mês	N.º de armadilhas positivas/instaladas	IPO	N.º de ovos	IDO
Nov	14/18	77,78	276	19,7
Dez	3/18	16,67	56	18,7
Jan	0/18	0,00	0	0,0
Fev	3/18	16,67	57	19,0
Mar	4/18	22,22	283	70,8
Abr	5/18	27,78	189	37,8
Mai	10/18	55,56	561	56,1

IPO= índice de positividade da ovitrampa

IDO= índice de densidade dos ovos

Tabela 2. Coeficientes de correlação entre precipitação pluvial, número de ovos de *Ae. aegypti* e casos de dengue. Boa Vista, RR, novembro de 2006 a maio de 2007.

Variável	N.º de ovos	IIN	IIC
Precipitação (mm)	+0,91	-0,55	-0,58
Quantidade de ovos	-	-0,57	-0,57
IIN	-	-	+0,98

IIN= índice de incidência de casos de dengue notificados

IIC= índice de incidência de casos de dengue confirmados

A Figura 1 apresenta um gráfico de dispersão entre número de ovos e índice pluviométrico, mostrando sua correlação positiva. Os gráficos das Figuras 2 e 3 ilustram a correlação do número de ovos, precipitação e índice de incidência de dengue, segundo mês.

Nenhum dos pools apresentou positividade para o vírus dengue, portanto não foi detectada sua transmissão transovariana em *Ae. aegypti*.

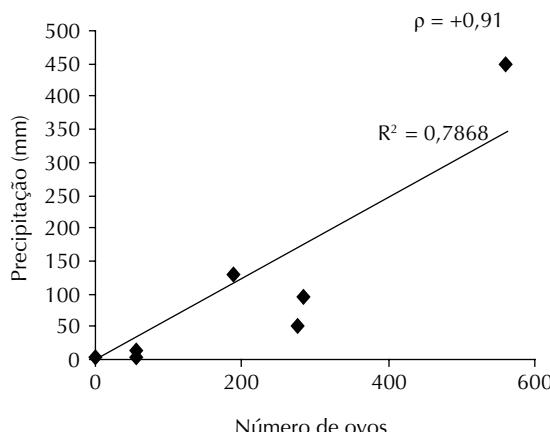


Figura 1. Correlação positiva (ρ) entre número de ovos de *Ae. aegypti* e precipitação pluvial. Boa Vista, RR, novembro de 2006 a maio de 2007.

DISCUSSÃO

A transmissão transovariana do vírus dengue em mosquitos ocorre em laboratório e natureza. Rosen et al.¹⁵ observaram maior taxa de transmissão vertical em *Ae. albopictus* em comparação com *Ae. aegypti*, tendo sido detectada a transmissão do sorotíp 1 por esta espécie. Em outros trabalhos, a transmissão transovariana dos sorotípos 2, 3 e 4 também foi detectada em *Ae. aegypti*.⁵⁻⁷ Segundo Joshi et al.,⁶ a transmissão transovariana permite ao vírus dengue persistir em gerações sucessivas de mosquitos, a taxas de 5% a 26% em laboratório, embora na natureza não deva ocorrer taxa maior que 20%.

No presente estudo, apesar da escolha de um bairro com elevados índices de incidência de dengue e alta infestação de *Ae. aegypti*, não se obteve positividade para o vírus em nenhum dos pools de larvas testados. Esses resultados são compatíveis com o de outros trabalhos de campo, como o realizado por Chow et al.,¹ que não detectou o vírus dengue em 53 pools de larvas (de 1 a 10 indivíduos) coletados em visita domiciliar. Pinheiro et al.,¹¹ em estudo realizado na cidade de Manaus, não encontraram o vírus dengue em 1.142 larvas coletadas por visita domiciliar, mas obtiveram uma TMI de 16% para mosquitos adultos. Fouque et al.³ encontraram TMI de 0,36% (1 mosquito infectado por 2.755 testados) em mosquitos criados a partir de ovos coletados por ovitrampas; e Khin & Than⁷ obtiveram taxa de 0,48% (1:2.067) em larvas coletadas em campo. Kow et al.⁸ detectaram taxa de 0,133% ao isolar vírus dengue de machos adultos de *Ae. aegypti* coletados em campo. Esses resultados sugerem que a transmissão transovariana do vírus dengue em *Ae. aegypti* parece ocorrer em uma freqüência muito baixa na natureza e sua importância na persistência do vírus em meio urbano pode não ser muito grande. Outras fontes de introdução do vírus, como o fluxo interestadual e internacional de pessoas, contribuíram mais para sua persistência no ambiente.

Em contrapartida, estudos realizados com mosquitos fêmeas adultas coletadas em campo obtêm taxa mínima de infecção elevada, como 8,52% detectado por Lourenço-de-Oliveira et al.,¹⁰ 16% por Urdaneta et al.,¹⁷ que coletou adultos de casas de pessoas com dengue e de casas vizinhas e de 57,6% por Chow et al.¹ Assim, a pesquisa de vírus dengue em larvas de *Ae. aegypti* não é o método mais adequado na previsão de epidemias, uma vez que sua taxa de infecção é baixa em relação ao uso de fêmeas adultas. Isso se deve ao fato de as fêmeas, ao realizarem repasto sangüíneo, terem muito mais chances de se infectar com o vírus dengue, não se limitando à transmissão transovariana.

A coleta de ovos por ovitrampas é um método prático para monitoramento da população do vetor, fornecendo alta positividade mesmo quando sua densidade

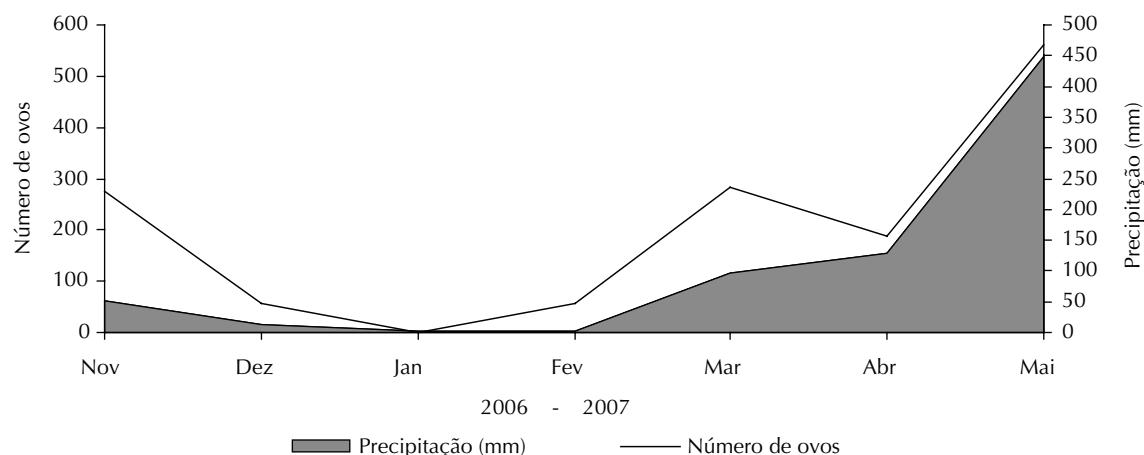


Figura 2. Número de ovos de *Ae. aegypti* e índice de precipitação pluvial. Boa Vista, RR, novembro de 2006 a maio de 2007.

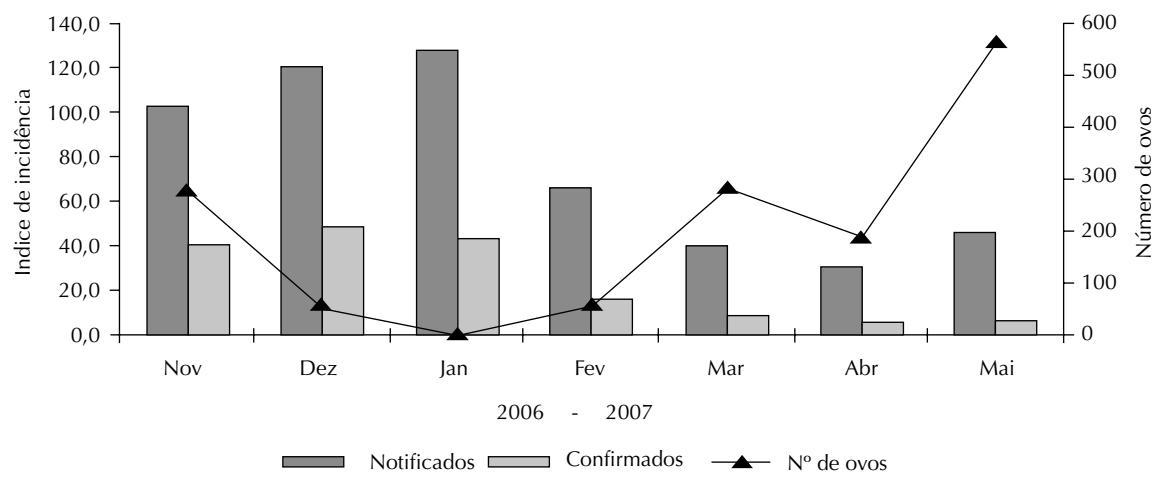


Figura 3. Número de ovos de *Ae. aegypti* e índice de incidência de casos notificados e confirmados de dengue. Boa Vista, RR, novembro de 2006 a maio de 2007.

populacional na região é baixa.¹³ A transmissão transovariana do vírus dengue em *Aedes aegypti* não foi detectada no bairro Mecejana, mesmo este sendo um bairro com altos índices de incidência de dengue e infestação pelo vetor, sugerindo que ela possa ocorrer a uma taxa muito baixa. Maior quantidade de ovos precisam ser coletados para pode calcular sua taxa mínima de infecção. Também por esse motivo, a pesquisa do vírus em larvas não é tão eficiente como ferramenta de vigilância epidemiológica quanto o uso de adultos, comprovadamente eficaz na predição de epidemias. No entanto, o uso de ovitrampas se confirmou como ferramenta para monitoramento da população do vetor.

Rosa-Freitas et al.,¹⁴ em um estudo sobre distribuição temporal e espacial de notificações de dengue em Boa Vista entre 1999 e 2001, não encontraram correlação entre o número de casos notificados e variáveis

metereológicas, apresentando padrão de distribuição distinto a cada ano. A despeito do que ocorre no restante do Brasil, onde a maioria dos casos ocorre em período chuvoso, em Boa Vista, picos de casos de dengue ocorrem tanto em período chuvoso quanto seco. Os resultados do presente estudo confirmam tal comportamento contraditório de correlação negativa para índice pluviométrico e índice de incidência de dengue. É possível que isso tenha ocorrido pelo fato de a notificação de casos não ser realizada adequadamente em períodos epidêmicos. Para próximos estudos, sugere-se que sejam feitas amostragens de casos de dengue nos postos de saúde em vez de utilizar dados de notificações do governo.

Em conclusão, a população de *Ae. aegypti* aumentou no período de chuvas provavelmente por causa do acúmulo de água em reservatórios naturais e/ou artificiais, proporcionando aumento de criadouros para eclosão

de ovos. Não se observou relação entre aumento na população do vetor e índice de incidência de dengue, fato já observado em estudos anteriores na cidade de Boa Vista, que pode ter sido gerado pela redução na notificação de casos de dengue nos períodos de epidemia pelos profissionais da saúde. A transmissão transovariana do vírus em mosquito mostrou-se ocorrer a uma freqüência muito baixa e é provável que este não seja um fator decisivo na persistência do dengue em meio urbano, uma vez que nesse ambiente a existência de hospedeiro infectado é muito mais freqüente.

AGRADECIMENTOS

À equipe da Coordenação de Entomologia e do Setor de Epidemiologia da Secretaria de Saúde do Estado de Roraima, pelo apoio nas coletas fornecimento de dados sobre casos de dengue e infestação por *Aedes aegypti* no município; ao pesquisador José Francisco Luitgards-Moura, ao técnico Almir Antônio Fontão Cunha e demais componentes da equipe do Núcleo Avançado de Vetores da Universidade Federal de Roraima pelo auxílio na identificação do material coletado.

REFERÊNCIAS

- Chow VTK, Chan YC, Yong R, Lee KM, Lim LK, Chung YK, et al. Monitoring of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;58(5):578-86.
- Consoli RAGB, Lourenço de Oliveira R. Princípios mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1994.
- Fouque F, Garnci R, Gaborit P. Epidemiological and entomological surveillance of the co-circulation of DEN-1, DEN-2 and DEN-4 viruses in French Guiana. *Trop Med Int Health.* 2004;9(1):41-6. DOI: 10.1046/j.1365-3156.2003.01166.x
- Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(3):480-96.
- Hull B, Tikasingh E, Souza M, Martinez R. Natural transovarial transmission of dengue 4 virus in *Aedes aegypti* in Trinidad. *Am J Trop Med Hyg.* 1984;33(6):1248-1250.
- Joshi V, Mourya DT, Sharma RC. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;67(2):158-61.
- Khin MM, Than KA. Transovarial transmission of dengue 2 virus by *Aedes aegypti* in nature. *Am J Trop Med Hyg.* 1983;32(3):590-4.
- Kow CY, Koon LL, Yin PF. Detection of Dengue Viruses in Field Caught Male *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Singapore by Type-Specific PCR. *J Med Entomol.* 2001;38(4):475-9.
- Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992;30(3):545-51.
- Lourenço de Oliveira R, Honório NA, Castro MG, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Alves JC, et al. Dengue virus type 3 isolation from *Aedes aegypti* in the municipality of Nova Iguaçu, State of Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(6):799-800. DOI: 10.1590/S0074-02762002000600009
- Pinheiro VCS, Tadei WP, Barros PMSS, Vasconcelos PFC, Cruz ACR. Detection of dengue virus serotype 3 by reverse transcription polymerase chain reaction in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) captured in Manaus, Amazonas. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100(8):833-9. DOI: 10.1590/S0074-02762005000800003
- Reiter P. Oviposition and dispersion of *Aedes aegypti* in a urban environment. *Bull Soc Pathol Exot.* 1996;89(2):120-2.
- Rosa EG, Lairihoy R, Leivas JC, González W, Paulino D. Monitoreo de *Aedes aegypti* mediante el uso de ovitrampas. *Entomol Vects.* 2003;10(4):451-6.
- Rosa-Freitas MG, Tsuris P, Sibajev A, Weimann ETS, Marques AU, Ferreira RL et al. Exploratory Temporal and Spatial Distribution Analysis of Dengue Notifications in Boa Vista, Roraima, Brazilian Amazon, 1999-2001. *Dengue Bull.* 2003;27:63-79.
- Rosen L, Shroyer DA, Tesh RB, Freier JE, Lien JC. Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg.* 1983;32(5):1108-19.
- Rosen L. Mechanism of vertical transmission of the dengue virus in mosquitoes. *C R Acad Sci III.* 1987;304(13):347-50.
- Urdaneta L, Herrera F, Pernalete M, Zoghbi N, Rubio-Palis Y, Barrios R, et al. Detection of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Maracay, Aragua state, Venezuela by type-specific polymerase chain reaction. *Infect Genet Evol.* 2005;5(2):177-84. DOI: 10.1016/j.meegid.2004.09.004
- World Health Organization. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention, and control. Geneva; 1997. p.48-59.