

NOTA TÉCNICA

## Detección molecular del virus de la fiebre amarilla en muestras de suero de casos fatales humanos y en cerebros de ratón

Jairo A. Méndez<sup>1</sup>, Gerzaín Rodríguez<sup>2</sup>, María del Pilar Bernal<sup>1</sup>, Dora de Calvache<sup>1</sup>, Jorge Boshell<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Virología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia.

<sup>2</sup> Laboratorio de Patología, Instituto Nacional de Salud; Facultad de Medicina, Universidad Nacional, Bogotá, D.C., Colombia.

Hemos adaptado un método molecular basado en la técnica de transcripción reversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para diagnóstico alternativo de la infección por el virus de la fiebre amarilla. Se tomaron tres sueros liofilizados de casos fatales de fiebre amarilla y cuatro sueros frescos, de los cuales tres pertenecían a casos fatales de la enfermedad y el cuarto a un paciente sintomático con serología IgM positiva para fiebre amarilla; los sueros fueron tratados con Trizol-LS® para extraer el ARN viral que fue sometido a reacción de RT y posteriormente a PCR, para la cual se diseñaron dos parejas de iniciadores específicos de fiebre amarilla: iniciadores directos (sentido) JM2104 (5'-CGTTGGGAGAGGAGATTC-3') y JM2249 (5'-TTCTTCACTTCGGTTGGG-3'), e iniciadores inversos (antisentido) JM2673 (5'-TCATCTGCCCTGCTTCTC-3') y JM2751 (5'-CCTCTCTGGTAAACATTCT-3'). La aplicación de la técnica en tejidos se hizo en cerebros de ratón infectados con el virus amarillo, tratados con una solución de lisis antes de purificar el ARN. En geles de agarosa se observaron bandas únicas de amplificación del tamaño esperado (569 pb y 502 pb); todas las muestras fueron corroboradas con las dos parejas de iniciadores y en dos de las muestras de suero fresco los resultados positivos para fiebre amarilla fueron comprobados con estudio histopatológico. Este método de detección molecular permitió demostrar de manera rápida y eficiente la presencia del virus de la fiebre amarilla, hecho que tiene importantes implicaciones diagnósticas para este problema de salud pública.

**Palabras clave:** virus de fiebre amarilla, RT-PCR, herramientas diagnósticas.

### **Molecular detection of yellow fever virus in human sera and mice brains**

A molecular method for the diagnosis of yellow fever virus infection was developed based on reverse transcription (RT) followed by polymerase chain reaction (PCR) amplification. Examinations were conducted on lyophilized sera from 3 fatal yellow fever cases and 4 fresh sera from 3 fatal cases and one from a symptomatic patient (positive IgM against yellow fever virus). Sera were extracted with TRIZOL-LS® to isolate viral RNA for RT treatment and the PCR reaction included 2 primers sets designed specifically for yellow fever virus: sense, JM2104 (5'-CGTTGGGAGAGGAGATTC-3') y JM2249 (5'-TTCTTCACTTCGGTTGGG-3'), and antisense, JM2673 (5'-TCATCTGCCCTGCTTCTC-3') y JM2751 (5'-CCTCTCTGGTAAACATTCT-3'). The technique for demonstrating the yellow fever virus in tissue samples was used in infected mice brains treated with lysis buffer before RNA extraction. PCR reactions were evaluated in agarose gels where single bands of the expected size for each primers pair (569bp and 502bp) were observed for all serum samples. In addition, the results for 2 fresh positive sera were supported by histopathologic finding of yellow fever virus. The RT-PCR method permits a rapid and specific demonstration of the presence of yellow fever virus.

**Key words:** yellow fever virus, RT-PCR, diagnostic tools.

El virus de la fiebre amarilla pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*, y es el responsable de una enfermedad hemorrágica aguda que aún hoy en día afecta a más de 200.000 personas al año en regiones tropicales de África y Suramérica a pesar de la existencia de una vacuna eficaz (1-4). El virus puede ser transmitido de un humano infectado a un humano susceptible por el mosquito doméstico *Aedes aegypti* o de primates no humanos a primates humanos por vectores selváticos, principalmente del género *Haemagogus* spp. (1-5). La infección con el virus puede ser asintomática o cursar con fiebre moderada en 40% a 65% de los pacientes hasta convertirse en una infección fatal fulminante caracterizada por postración, daño hepático, renal y cardíaco y choque en 35%-60% de los casos; la letalidad en casos graves varía entre 20% y 50% (6).

El reciente incremento en la densidad y distribución de *A. aegypti*, así como el aumento de viajeros internacionales, han elevado el riesgo de infección en diversas áreas de Norte y Suramérica (7-9); en Colombia, aunque el último brote urbano ocurrió en 1929 en Socorro, Santander, se han confirmado más de 30 casos selváticos desde la década del 70 (10-15) y, en la actualidad, aproximadamente 5 millones de personas están en riesgo potencial de padecer fiebre amarilla.

Es difícil realizar un diagnóstico rápido y acertado de la fiebre amarilla, ya que puede confundirse con otras hepatitis virales, malaria, otras fiebres hemorrágicas producidas por arbovirus como el dengue o por Arenavirus, infecciones bacterianas y enfermedades debidas a sustancias tóxicas (5); el virus es generalmente indetectable durante la fase tardía de la enfermedad y, debido a la presencia de anticuerpos IgM, su aislamiento en células de mosquito no siempre es exitoso (1-5); aunque el estudio histopatológico con inmunohistoquímica en cortes de hígado

constituye una valiosa herramienta para el diagnóstico de esta enfermedad en casos fatales (16,17), la necesidad de una viscerotomía y su transporte inmediato al laboratorio en condiciones adecuadas son indispensables para lograr el diagnóstico. Por otra parte, la biopsia hepática para ver los cambios histológicos típicos está absolutamente contraindicada, ya que se puede generar una hemorragia letal.

Teniendo en cuenta la necesidad de un diagnóstico rápido durante la fase temprana de la enfermedad, se han desarrollado técnicas alternativas basadas en la detección de ARN viral que permiten un diagnóstico preciso y eficiente (5,18); por esta razón, hemos adaptado en nuestro laboratorio una técnica de transcripción reversa-reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR), que nos permite detectar de manera específica el virus de la fiebre amarilla a partir de muestras de suero, lo cual permite el diagnóstico rápido de esta entidad; además, esta técnica molecular ha sido aplicada al modelo de ratón con el fin de realizar la detección a partir de muestras de tejido y poder así llegar a complementar el estudio de la enfermedad en humanos; por otro lado, los fragmentos amplificados pertenecen a la región intergénica E/NS1, la cual se ha utilizado en otros arbovirus como el dengue para realizar análisis filogenéticos (19,20) por lo que se podría realizar una vigilancia de los genotipos circulantes y su distribución en nuestro medio.

## **Materiales y métodos**

### ***Muestras de suero y cerebros de ratón***

Se procesaron cuatro sueros frescos (menos de 24 horas de tomados), dos de pacientes fallecidos con un cuadro clínico sugestivo de fiebre amarilla y diagnóstico confirmado por histopatología (Vichada, 2002-Guaviare, 2002), un suero de un caso fatal con diagnóstico clínico y epidemiológico de fiebre amarilla, el cual no fue posible diagnosticar por histopatología (Guaviare, 2001), y un suero de un paciente fallecido con serología (IgM) positiva para fiebre amarilla (Guaviare, 2002); paralelamente se procesaron tres sueros liofilizados de pacientes muertos por fiebre amarilla, conservados en la seroteca del Laboratorio de Virología del INS, que dieron origen

#### **Correspondencia:**

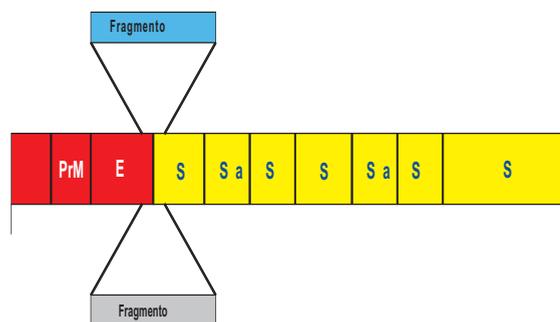
Jairo A. Méndez, Avenida calle 26 No. 51-60, Bogotá, D.C., Teléfono (571) 220 7700, extensión 549; fax (571) 220 0928. jairoandres46@hotmail.com

Recibido: 11/12/02; aceptado: 17/03/03

a los lotes V-408, V-413 y V-423 (Meta, 1975), los cuales fueron rehidratados con 0,5 ml de tampón fosfato salino (PBS) estéril. Por otro lado, dos familias de ratones lactantes fueron inoculadas intracerebralmente con 0,1 ml de una suspensión del lote viral V-408; una vez que los ratones mostraron señales de enfermedad se sacrificaron y los cerebros fueron extraídos y congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

### Diseño de los iniciadores

Los iniciadores fueron diseñados sobre la secuencia genómica de la cepa prototipo Asibi (21) y analizados con el programa *Gene Runner* versión 3.0 (Hastings Software, Inc.), con el cual se determinó la temperatura de anillaje y se descartó la presencia de dímeros y otras estructuras secundarias; de esta manera, se diseñaron los iniciadores directos (sentido) JM2104 (5'-CGTTGGGAGAGGAGATTC-3') y JM2249 (5'-TTCTTCACTTCGGTTGGG-3'), y los iniciadores inversos (antisentido) JM2673 (5'-TCATCTGCCCTGCTTCTC-3') y JM2751 (5'-CCTCTCTGGTAAACATTCT-3'); el nombre dado a cada iniciador indica su posición sobre el genoma y corresponde a la unión de los genes E/NS1. El tamaño esperado de amplificación con la pareja de iniciadores JM2104/JM2673 correspondía a 569 pares de bases (pb), mientras que con la pareja



**Figura 1.** El genoma del virus de la fiebre amarilla contiene un único marco de lectura abierto de 10.233 nucleótidos, que codifica 3 proteínas estructurales (C=central, prM=matriz, E=envoltura) y 7 proteínas no estructurales (NS); se diseñaron 2 parejas de iniciadores que anillan en la región de unión de los genes E/NS1; la proyección en azul representa el fragmento amplificado con la pareja de iniciadores JM2104/JM2673 (569 pb), mientras que la proyección en gris muestra el producto de amplificación con los iniciadores JM2249/JM2751 (502 pb).

JM2249/2751 se esperaba un fragmento de 502 pb (figura 1).

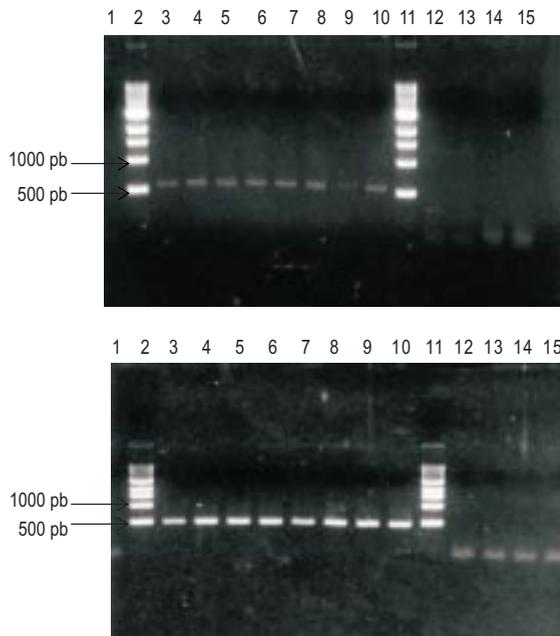
### Extracción del ARN y RT-PCR

Se tomaron 300  $\mu\text{l}$  de cada suero, los cuales fueron tratados con 700  $\mu\text{l}$  del reactivo de Trizol-LS® (Gibco BRL) durante 5 minutos; posteriormente, se adicionaron 200  $\mu\text{l}$  de cloroformo y se agitaron durante 15 segundos; mediante centrifugación a 12.000 rpm durante 15 minutos se obtuvo una fase acuosa, la cual fue separada y tratada con 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol frío durante 10 minutos; después de centrifugar a 12.000 rpm durante 10 minutos, el ARN obtenido se lavó con 500  $\mu\text{l}$  de etanol al 75% y, posteriormente, se resuspendió en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma) y con 20 unidades de inhibidor de ARNasas (CPG Inc.); las muestras de cerebro se trataron con 300  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis (tris-HCl 100 mM, pH 8,5, EDTA 0,5 M, SDS 10%, proteinasa K 25 mg/mL y 20 unidades de inhibidor de ARNasas) a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 3 horas; el ARN se extrajo posteriormente con Trizol-LS® (GIBCO BRL) como se describió previamente; 15  $\mu\text{l}$  del ARN se sometieron a la reacción de transcripción reversa (RT) bajo las siguientes condiciones: 5  $\mu\text{l}$  de tampón 6x para transcripción (New England Biolabs), 3  $\mu\text{L}$  de ditiotreitól (DTT) 0,1 M (Sigma), 1,5  $\mu\text{l}$  de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) 10 mM (CPG Inc.), 1,5  $\mu\text{l}$  de transcriptasa reversa M-MLV 200 u/ $\mu\text{l}$  (New England Biolabs) y 3  $\mu\text{L}$  del iniciador antisentido (JM2673 o JM2751) 10  $\mu\text{M}$ ; la reacción de transcripción reversa se realizó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante una hora y el ADNc generado se utilizó como templado en una reacción de PCR con los iniciadores específicos diseñados para fiebre amarilla, en las siguientes condiciones: 5  $\mu\text{l}$  de tampón de PCR 10x (CPG Inc.), 1  $\mu\text{l}$  de dNTP (mezcla con 10 mM de cada uno, CPG Inc.), 1  $\mu\text{l}$  de iniciador sentido (JM2104 o JM2249) 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{l}$  de iniciador antisentido (JM2673 o JM2751) 10  $\mu\text{M}$  y 2,5 U de taq polimerasa (CPG Inc.), en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ ; la reacción se realizó en un termociclador (Perkin Elmer) con 35 ciclos de denaturación ( $94^{\circ}\text{C}$ ), anillaje ( $55^{\circ}\text{C}$ ) y extensión ( $72^{\circ}\text{C}$ ). Para evaluar la especificidad de los iniciadores y determinar la reacción cruzada, se realizó paralelamente el mismo procedimiento

de extracción de ARN y RT-PCR con virus dengue purificado (serotipos 1, 2, 3 y 4), así como cerebros de ratón sin infectar con el virus amarílico; los productos de amplificación obtenidos para cada reacción de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

### Resultados

Se analizó el diseño de las dos parejas de iniciadores (JM2104/JM2673 y JM2249/JM2751) y no se encontró formación de dímeros ni estructuras secundarias que pudieran alterar los resultados de la amplificación; con la primera pareja de iniciadores se obtuvo una banda única de amplificación a la altura esperada de 569 pb (figura 2a) tanto en las cuatro muestras de suero fresco como en los tres sueros liofilizados; así



**Figura 2a y b.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñida con bromuro de etidio de los productos amplificados con los iniciadores JM2104/JM2263 (2a) y JM2249/JM2751 (2b) del virus de la fiebre amarilla. Carril 1: control negativo; carril 2: marcadores de peso molecular (MPM) 1kb *DNA ladder* (New England Biolabs); carriles 3-6: sueros frescos; carriles 7-9: sueros liofilizados; carril 10: cerebro de ratón infectado con el virus de fiebre amarilla V-408; carril 11: MPM; carril 12: dengue 1; carril 13: dengue 2; carril 14: dengue 3; carril 15: dengue 4.

mismo, todas las muestras fueron positivas al realizar la amplificación con la segunda pareja de iniciadores, demostrándose una banda clara a la altura de 502 pb (figura 2b); es importante notar, además, que los controles negativos utilizados (reacción de PCR con agua estéril en reemplazo del templado) no amplificaron, lo cual descarta una posible contaminación de la reacción. Paralelamente, las dos parejas de iniciadores se probaron en diferentes reacciones de PCR, utilizando como templado ADNc de cada uno de los serotipos del virus del dengue (dengue 1, 2, 3 y 4), para determinar reacción cruzada o amplificaciones inespecíficas; no se observó ninguna banda de amplificación en dichos ensayos. Una vez los cerebros de ratón fueron tratados con tampón de lisis, se realizó la extracción y purificación del ARN con la posterior detección viral por RT-PCR; se obtuvieron así las respectivas bandas de amplificación de los tamaños esperados para cada pareja de iniciadores (569 pb y 502 pb, figura 2a y b); como control negativo se utilizaron cerebros de ratón sin infectar, cuya amplificación resultó negativa con los iniciadores evaluados.

### Discusión

Un espectro claro y definido de síntomas en un paciente no vacunado contra la fiebre amarilla y con historia de permanencia en una zona endémica de la enfermedad permite sospechar clínicamente la infección por el virus amarílico; sin embargo, en la mayoría de los casos no es posible conocer los antecedentes vacunales del paciente y los síntomas exigen un diagnóstico diferencial con entidades que semejan la fiebre amarilla tales como la leptospirosis, que cursa con ictericia, hemorragias, coagulación intravascular diseminada y una alta tasa de fatalidad; se deben descartar también la malaria grave, las hepatitis virales fulminantes, principalmente las producidas por virus B-delta, y otras patologías como el dengue hemorrágico, que presenta síntomas muy parecidos (1-5).

El diagnóstico específico de la enfermedad puede hacerse aplicando pruebas de laboratorio basadas en la detección del virus en la sangre o por serología; el aislamiento viral puede realizarse

mediante inoculación intracerebral en ratones lactantes, inoculación intratorácica de mosquitos o inoculación en cultivos celulares (1,2); el diagnóstico serológico incluye la técnica de inhibición de la hemaglutinación, neutralización y determinación de anticuerpos IgM por ELISA (22); los primeros proveen un diagnóstico presuntivo positivo en la fase temprana de la convalecencia que debe ser confirmado con una muestra pareada que demuestre la elevación de los títulos (1,2,23), mientras que la ELISA para detección de IgM requiere una sola muestra de suero; por otro lado, el análisis histopatológico del hígado *postmortem*, con o sin inmunohistoquímica, revela una imagen típica que permite confirmar el diagnóstico (1,2,5,16,17).

A pesar de todas las ayudas diagnósticas no siempre es fácil confirmar un caso de fiebre amarilla, ya que las muestras de suero para aislamiento pueden no conservarse en congelación hasta su procesamiento, lo cual puede generar un porcentaje de falsos negativos; además, la reacción cruzada con otros Flavivirus dificulta el diagnóstico; para enfrentar estas dificultades, se han desarrollado técnicas de biología molecular que permiten la detección específica del material genético viral de Flavivirus relacionados, tales como la RT-PCR (24-25), PCR anidada (26) o la PCR multiplex (27); en 1994, Pierre y colaboradores desarrollaron un conjunto de iniciadores universales para lograr la detección de diferentes Flavivirus en muestras de suero (18); sin embargo, dada la necesidad de identificar específicamente el virus de la fiebre amarilla, Deubel y colaboradores describieron una técnica de PCR semianidada, en la cual se observaron varias bandas de amplificación en gel de agarosa al realizar la técnica sobre tejido hepático, por lo cual era necesario realizar una hibridación molecular posterior (*dot blot*) con una sonda específica, lo que implica un mayor tiempo para el diagnóstico y una mayor complejidad (5).

En nuestro estudio, mediante la aplicación de la RT-PCR, logramos detectar el virus de la fiebre amarilla a partir de muestras de suero y de cerebros de ratón, amplificando una banda muy evidente en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. La especificidad de nuestro ensayo

radica en la habilidad de los iniciadores diseñados para reconocer una secuencia del genoma viral y generar un fragmento único de amplificación del tamaño esperado; además, no se observó reacción cruzada al probar los iniciadores con ADNc de los cuatro serotipos del virus del dengue, un Flavivirus genéticamente relacionado con el de la fiebre amarilla y de alta circulación en nuestro medio, lo que indica el gran potencial de la técnica para hacer una identificación acertada en muestras provenientes de zonas donde los dos virus son endémicos.

Aunque dos de los sueros frescos no tenían un diagnóstico histopatológico confirmatorio, se descartó la posibilidad de un falso positivo en la RT-PCR, no sólo por las estrictas precauciones tomadas para prevenir cualquier tipo de contaminación tales como la manipulación pre y post-PCR en diferentes espacios físicos y la utilización de controles negativos sin ARN en cada ensayo, sino, además, porque los antecedentes epidemiológicos y clínicos de los pacientes sugerían fuertemente la probabilidad de fiebre amarilla; adicionalmente, uno de estos sueros presentaba una IgM positiva para fiebre amarilla que permitía sustentar el diagnóstico.

A pesar de la baja cantidad de muestras evaluadas y de la necesidad de mayores estudios para lograr una estandarización adecuada, los resultados obtenidos nos permiten inferir una alta sensibilidad de la técnica de RT-PCR comparada con el aislamiento viral, ya que, según los registros del Laboratorio de Virología del INS, no fue posible replicar el virus en cultivo a partir de ninguno de los cuatro sueros frescos, aún con evidencia histopatológica de la enfermedad en dos de ellos. Esta situación puede presentarse durante el diagnóstico de otros arbovirus como el dengue, en el cual la presencia de anticuerpos IgM en muestras tomadas alrededor del quinto o sexto día de iniciados los síntomas causan la neutralización del virus impidiendo su entrada a las células, lo que limita la sensibilidad del aislamiento (28); sin embargo, en nuestro estudio fue posible amplificar una de las muestras aún en presencia de IgM, ya que durante el proceso de extracción y purificación del ARN viral todas las proteínas séricas (incluidas las inmunoglobulinas)

se separaron para facilitar la detección del material genético. De esta manera, la técnica evaluada permite demostrar la presencia del virus aun durante el final de la fase aguda, cuando el aislamiento suele ser negativo.

Algunos autores han mostrado un especial interés en la posibilidad de falsos negativos a partir de muestras de suero, debido a la inhibición de la reacción de RT-PCR por componentes celulares derivados del daño tisular generado durante una fiebre hemorrágica viral grave, particularmente en infecciones causadas por el virus de la fiebre amarilla o el virus Ebola (29); en el caso de las muestras evaluadas en nuestro estudio, no se observó inhibición de la reacción en ninguno de los sueros evaluados; por el contrario, las bandas de amplificación fueron muy evidentes lo que demuestra una alta eficiencia del método de extracción del ARN cuando los posibles inhibidores pueden haber sido eliminados; sin embargo, la posibilidad de observar falsos negativos debe ser evaluada mediante el análisis de un mayor número de sueros y debe tenerse siempre en cuenta en el momento de aplicar la técnica para el diagnóstico de rutina en el laboratorio. Así, para detectar inhibidores se recomienda utilizar siempre un ARN control en un duplicado de la muestra y, además, probar en paralelo diluciones del suero original (29).

Por otro lado, la región intergénica E/NS1 amplificada en este trabajo ha sido ampliamente utilizada para estudiar la evolución y distribución de los virus del dengue (19,20), lo cual puede aplicarse a un virus genéticamente parecido como el de la fiebre amarilla, que puede tener deleciones y variaciones dependiendo de las regiones geográficas donde se aisle (5,30-32); de esta manera, se puede hacer un estudio retrospectivo usando cortes de parafina de casos con diagnóstico específico para determinar el origen filogenético de las cepas circulantes en nuestro medio durante diferentes períodos de tiempo. Aunque se debe evaluar un mayor número de muestras, este estudio preliminar demuestra la importancia de aplicar métodos moleculares como la RT-PCR para agilizar y mejorar el diagnóstico específico de la fiebre amarilla en el laboratorio y complementar los métodos serológicos,

histopatológicos e inmunohistoquímicos que siguen siendo útiles; disponer de este método en nuestro medio constituye una nueva herramienta importante para un rápido diagnóstico y control de la enfermedad.

### Agradecimientos

Agradecemos al Programa de Enfermedades Transmitidas por Vectores (ETV) de la Subdirección de Epidemiología del Instituto Nacional de Salud, INS, por el apoyo logístico y la financiación del trabajo.

### Referencias

1. **Groot H, Boshell J.** Dengue, dengue hemorrágico y fiebre amarilla. En: Chalem F, Escandón JE, Campos J, Esguerra R, editores. Medicina interna. Bogotá: Doyma Andina S.A.; 1992. p.1389-95.
2. **Monath TP.** Yellow fever: an update. *Lancet Inf Dis* 2001; 1:11-20.
3. **Tesh R.** Viral hemorrhagic fevers of South America. *Biomédica* 2002;22:287-95.
4. **Oyewale T.** Yellow fever in Africa: public health impact and prospects for control in the 21st century. *Biomédica* 2002;22:178-93.
5. **Deubel V, Huerre M, Cathomas G, Drouet MT, Wuscher N, LeGuanno B, et al.** Molecular detection and characterization of yellow fever virus in blood and liver specimens of a non-vaccinated fatal human case. *J Med Virol* 1997;53:212-7.
6. **Digoutte JP, Cornet M, Deubel V, Downs WG.** Yellow fever. En: Porterfield JS, editor. Exotic viral infections. London: Chapman & Hall Medical; 1995. p.67-102.
7. **Robertson SE, Hull BP, Tomori O, Belec O, LeDuc JW, Esteves K.** Yellow fever. A decade of reemergence. *JAMA* 1996;276:1157-62.
8. **Digoutte JP, Plassart H, Salaun JJ.** A propos de trois cas de fièvre jaune contractée au Sénégal. *Bull WHO* 1991;59:759-66.
9. **Barros MLB, Boecken G.** Jungle yellow fever in the central Amazon. *Lancet* 1996;348:969-70.
10. **Groot H, Morales A, Romero M, Ferro C, Prías E, Vidales H, et al.** Estudios de arbovirosis en Colombia en la década de 1970. *Biomédica* 1996;16:331-44.
11. **Vidales H, Buitrago B, Sanín LH, Morales A, Groot H.** Estudio de un brote epidémico de fiebre amarilla selvática en el piedemonte de la Sierra Nevada de Santa Marta, 1979. *Biomédica* 1981;1:171-8.
12. **Rodríguez G, Ordóñez N, Boshell J.** 1998: un año sin casos de fiebre amarilla por viscerotomía. *Inf Quinc Epidemiol Nac* 1999;4:3-7.

13. Cáceres DC. La fiebre amarilla y su vigilancia en salud pública. *Inf Quinc Epidemiol Nac* 1999;4:7-11.
14. García I, Velandia MP, Olano VA, Molina J, Salas T, Bernal MP, *et al.* Sistema de vigilancia centinela sobre enfermedades febriles transmitidas por vectores con énfasis en fiebre amarilla, dengue y malaria en los departamentos de Caquetá, Nariño, Putumayo, La Guajira y Valle, 2000. *Inf Quinc Epidemiol Nac* 2001;6:1-8.
15. Porras A, de la Hoz F, Velandia MP, Ramírez O, Buitrago LS, Herrera M, *et al.* Informe epidemiológico sobre un posible brote de fiebre amarilla en el departamento del Meta, 30 de mayo a 1 de junio de 2001. *Inf Quinc Epidemiol Nac* 2001;6:273-6.
16. Monath TP, Ballinger ME, Miller BR, Salaun JJ. Detection of yellow fever viral RNA by nucleic acid hybridization and viral antigen by immunocytochemistry in fixed human liver. *Am J Trop Med Hyg* 1989;40:663-8.
17. Ricaurte O, Sarmiento L, Caldas ML, Rodríguez G. Evaluación de un método inmunohistoquímico para el diagnóstico de la fiebre amarilla. *Biomédica* 1993;13:15-9.
18. Pierre V, Drouet MT, Deubel V. Identification of mosquito-borne flavivirus sequences using universal primers and reverse transcription/polymerase chain reaction. *Res Virol* 1994;145:93-104.
19. Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 1990; 174:479-93.
20. Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, *et al.* Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 1997;230:244-51.
21. Hahn CS, Dalrymple JH, Strauss JH, Rice CM. Comparison of the virulent Asibi strain of yellow fever virus with the 17D vaccine strain derived from it. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:2019-23.
22. Boshell J, Groot H, Gacharná MG, Márquez G, González M, Gaitán M, *et al.* Dengue en Colombia. *Biomédica* 1986;6:101-6.
23. Monath TP, Nystrom RR. Detection of yellow fever virus in serum by enzyme immunoassay. *Am J Trop Med Hyg* 1984;33:151-7.
24. Sudiro TM, Ishiko H, Green S, Vaughn DW, Nisalak A, Kalayanarooj S, *et al.* Rapid diagnosis of dengue viremia by reverse transcriptase-polymerase chain reaction using 3'-noncoding region universal primers. *Am J Trop Med Hyg* 1997;56:424-9.
25. Deubel V, Laille M, Hugnot JP, Chungue E, Guesdon JL, Drouet MT, *et al.* Identification of dengue sequences by genomic amplification: rapid diagnosis of dengue virus serotype in peripheral blood. *J Virol Methods* 1990;30:41-54.
26. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler D, 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;30:545-51.
27. Harris E, Roberts TG, Smith L, Selle J, Kramer LD, Valle S, *et al.* Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* 1998;36: 2634-9.
28. Balmaseda A, Sandoval E, Pérez L, Gutiérrez CM, Harris E. Application of molecular typing techniques in the 1998 dengue epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 1999;61:893-7.
29. Drosten C, Panning M, Guenther S, Schmitz H. False-negative results of PCR assay with plasma of patients with severe viral hemorrhagic fever. *J Clin Microbiol* 2002;40:4394-5.
30. Deubel V, Pailliez JP, Cornet M, Schlesinger JJ, Diop M, Digoutte JP, *et al.* Homogeneity among Senegalese strains of yellow fever virus. *Am J Trop Med Hyg* 1985;34: 976-83.
31. Wang E, Weaver SC, Shope RE, Tesh RB, Watts DM, Barret ADT. Genetic variation in yellow fever virus: duplication in the 3' noncoding region of strains from Africa. *Virology* 1996;225:274-81.
32. Deubel V, Drouet MT. Biological and molecular variations of yellow fever virus strains. En: Saluzzo JF, Dodet B, editors. *Factors in the emergence of arbovirus diseases*. Paris: Elsevier; 1997. p.157-65.