

**RIDASCREEN® Dengue Virus IgG,  
RIDASCREEN® Dengue Virus IgM  $\mu$ -capture**

**REF** K8221  
K8231



## 1. Zweckbestimmung

Für die *in vitro* Diagnostik. Die RIDASCREEN® Dengue Virus Tests sind Enzymimmunoassays zum qualitativen Nachweis von IgG- oder IgM-Antikörpern gegen das Dengue Virus in humanem Serum oder Plasma

Der Test sollte bei begründetem Verdacht auf eine Dengue Virus Infektion durchgeführt werden.

## 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Dengue Viren sind umhüllte Einzelstrang RNA Viren von etwa 50 nm Durchmesser. Sie gehören zur Familie der Flaviviridae. Man unterscheidet vier Serotypen (DEN-1, DEN-2, DEN-3 und DEN-4).

Dengue Viren sind weltweit verbreitet. In Süd- und Mittelamerika, Westafrika, Südostasien und im Westpazifischen Ozean ist Dengue-Fieber endemisch. Ihr bevorzugter Wirt ist der Mensch. Die Übertragung erfolgt durch Stechmücken der Spezies *Aedes aegypti*.

Dengue hat eine Inkubationszeit von 3 bis 14 Tagen. Die meisten Fälle verlaufen mild, ähnlich einem grippalen Infekt. Die Symptome umfassen Fieber mit Schüttelfrost und starken Kopf-, Muskel- und Gliederschmerzen. Zusammen mit einem Exanthem werden diese Symptome auch als Denguetrias bezeichnet. Die Krankheit klingt bei den meisten Patienten nach 3 bis 7 Tagen wieder ab. In ungefähr 2 - 4 % der Fälle jedoch nimmt die Krankheit einen schweren Verlauf und ein Dengue-Hämorrhagisches-Fieber (DHF) oder ein Dengue-Schock-Syndrom (DSS) kann auftreten. Diese schweren Verläufe enden in 1 - 5 % aller Fälle tödlich, die Sterblichkeitsraten können bei einzelnen Epidemien aber auch 15 % erreichen. Nach überstandener Infektion besteht für kurze Zeit Immunität gegen alle Serotypen und lebenslange Immunität gegen den infizierenden Stamm. Eine Zweitinfektion mit einem anderen Serotyp verläuft meist schwerer. Eine Schutzimpfung ist nicht verfügbar.

Aufgrund der Reaktion des Immunsystems kommt es nach einer Infektion mit Dengue Virus zur Bildung von spezifischen Antikörpern gegen den Erreger. Diese können im Serum oder Plasma mit Hilfe von immunologischen Verfahren nachgewiesen werden. Für die Aussagekraft eines Tests ist dabei neben der Auswahl des verwendeten, erregerspezifischen Antigens auch die verwendete Testmethode von Bedeutung.

## 3. Testprinzip

### RIDASCREEN® Dengue Virus IgG

Gereinigte Antigene sind an eine Mikrotiterplatte gebunden. In Patientenproben vorhandene Antikörper binden an die Antigene und werden in einem zweiten Schritt mit einem enzymmarkierten anti-human-Antikörper Conjugate IgG nachgewiesen.

Durch das Enzym wird ein farbloses Substrat ( $\text{H}_2\text{O}_2/\text{TMB}$ ) zu einem blauen Endprodukt umgesetzt. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe von Schwefelsäure beendet. Dabei erfolgt gleichzeitig ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die abschließende Messung erfolgt in einem Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge  $\geq 620$  nm).

#### RIDASCREEN® Dengue Virus IgM $\mu$ -capture

Anti-human IgM-Antikörper sind an eine Mikrotiterplatte gebunden. In Patientenproben vorhandene IgM-Antikörper binden an die Anti-human IgM-Antikörper. Ungebundenes Probenmaterial wird durch Waschen entfernt. Anschließend wird eine Mischung aus Dengue-Virus Antigen und enzymmarkierten anti-Dengue-Virus-Antikörpern zugegeben. In positiven Proben bindet dieser Komplex an immobilisierte Dengue-Virus-spezifische Antikörper. Durch das Enzym wird ein farbloses Substrat ( $\text{H}_2\text{O}_2/\text{TMB}$ ) zu einem blauen Endprodukt umgesetzt. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe von Schwefelsäure beendet. Dabei erfolgt gleichzeitig ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die abschließende Messung erfolgt in einem Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge  $\geq 620$  nm).

#### 4. Packungsinhalt

**Tab. 1:** Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen)

			K8221 IgG	K8231 IgM
Plate	96 Best.	Mikrotiterplatte; 12 Mikrotiterstreifen (teilbar) im Halterahmen; beschichtet mit Dengue Virus-Antigen (Typ 2)	X	
Plate	96 Best.	Mikrotiterplatte; 12 Mikrotiterstreifen (teilbar) im Halterahmen; beschichtet mit anti-human IgM-Antikörpern		X
Diluent	100 ml	Probenpuffer, gebrauchsfertig; Phosphat-Puffer, gelb gefärbt	X	X
Wash	50 ml	Waschpuffer, 20fach konzentriert; Phosphat-Puffer	X	X
Control IgG + roter Deckel	2 ml	Positivkontrolle IgG, gebrauchsfertig; verdünntes Humanserum oder Plasma; gelb gefärbt	X	
Control IgG - blauer Deckel	2 ml	Negativkontrolle IgG, gebrauchsfertig; verdünntes Humanserum oder Plasma; gelb gefärbt	X	
Cut-off IgG grüner Deckel	3 ml	Cut-off Kontrolle IgG, gebrauchsfertig; verdünntes Humanserum oder Plasma; gelb gefärbt	X	
Control IgM + roter Deckel	2 ml	Positivkontrolle IgM, gebrauchsfertig; verdünntes Humanserum oder Plasma; gelb gefärbt		X
Control IgM - blauer Deckel	2 ml	Negativkontrolle IgM, gebrauchsfertig; verdünntes Humanserum oder Plasma; gelb gefärbt		X
Cut-off IgM grüner Deckel	3 ml	Cut-off Kontrolle IgM, gebrauchsfertig; verdünntes Humanserum oder Plasma; gelb gefärbt		X
Conjugate IgG schwarzer Deckel	20 ml	Anti-human-IgG-Konjugat, gebrauchsfertig; Peroxidase-konjug. Antikörper, blau gefärbt	X	
Conjugate IgM schwarzer Deckel	15 ml	Dengue Virus-Konjugat, Peroxidase-konjug. Anti-Dengue Virus Antikörper, rot gefärbt		X
Ag LYO roter Deckel	2 ml	Dengue Antigen, lyophilisiert; nach Rekonstitution in 2ml Konjugat IgM einsetzbar		X
Substrate gelber Deckel	15 ml	Substrat, gebrauchsfertig; H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Tetramethylbenzidin	X	X
Stop roter Deckel	15 ml	Stopp-Reagenz, gebrauchsfertig 0,2 mol/l Schwefelsäure	X	X

Gefahrstoffangabe gemäß Kennzeichnungspflicht. Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) auf [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 5. Reagenzien und ihre Lagerung

Das Testkit ist bei einer Lagerung von 2 - 8 °C bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum verwendbar. Der verdünnte Waschpuffer ist bei einer Lagerung von 2 - 8 °C vier Wochen, bei einer Lagerung bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) fünf Tage haltbar. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

Der Alu-Beutel, in dem sich die Mikrotiterplatte befindet, ist so zu öffnen, dass der Klippverschluss nicht abgetrennt wird. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen sind im verschlossenen Alu-Beutel zu lagern.

Eine Kontamination der Reagenzien ist ebenso zu vermeiden wie eine direkte Lichteinwirkung auf das farblose Substrat.

## 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

### 6.1. Reagenzien

–destilliertes oder deionisiertes Wasser

### 6.2. Zubehör

–Probenröhrchen

–Inkubator 37 °C

–Vortex Mixer

–Mikropipetten für 10 - 100 µl und 100 - 1000 µl Volumina

–Messzylinder (1000 ml)

–Waschgerät für Mikrotiterplatten oder Mehrkanalpipette

–Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm, Referenzfilter ≥ 620 nm)

–Filterpapier (Labortücher)

–Abfallbehälter mit einer 0,5 %igen Hypochloritlösung

## 7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten. Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.

Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen. In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

Die im Kit befindlichen Kontrollseren (Positivkontrolle, Cut-off Kontrolle und Negativkontrolle) wurden auf HIV- und HCV-Ak sowie HbsAg untersucht und für negativ befunden. Dennoch sollten sie, ebenso wie die Patientenproben und alle Materialien, die mit ihnen in Berührung kommen, als potentiell infektiös behandelt und entsprechend den jeweiligen nationalen Sicherheitsbestimmungen gehandhabt werden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften!

## 8. Sammlung und Lagerung der Proben

Der Test ist für die Untersuchung humaner Serum- und Plasmaproben entwickelt worden. Nach der Blutentnahme sollte zur Vermeidung einer Hämolyse das Serum möglichst schnell vom Blutkuchen getrennt werden. Die Proben sind bis zur Testung kühl oder gefroren zu lagern. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Proben ist unbedingt zu vermeiden, ebenso mikrobielle Kontamination. Die Verwendung von Hitze inaktivierten, lipämischen, hämolytischen, ikterischen oder trüben Proben kann zu verfälschten Ergebnissen führen.

**Tab. 2:** Probenlagerung

unverdünntes Serum oder Plasma		verdünntes Serum oder Plasma
2 - 8 °C	-20 °C	2 - 8 °C
1 Woche	> 1 Woche	7 Stunden

## 9. Testdurchführung

### 9.1. Allgemeines

Vor Verwendung sind alle Reagenzien und die Mikrotiterstreifen auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) zu bringen. Die Mikrotiterstreifen sind erst nach Erreichen der Raumtemperatur dem Alu-Beutel zu entnehmen. Die Reagenzien sind unmittelbar vor der Verwendung gut zu mischen. Nach dem Gebrauch ist das Kit sofort wieder bei 2 - 8 °C zu lagern.

Es sollte nur so viel Reagenz entnommen werden, wie für die Durchführung des Tests benötigt wird. Überschüssiges Reagenz darf nicht in die Gefäße zurückgegeben werden, da dies zu einer Kontamination führen kann.

Die Mikrotiterstreifen können nicht mehrfach verwendet werden. Reagenzien und Mikrotiterstreifen dürfen nicht verwendet werden, wenn die Verpackung beschädigt ist oder die Gefäße undicht sind.

## 9.2. Herstellung des Waschpuffers

1 Teil des Waschpuffer-Konzentrates Wash wird mit 19 Teilen destillierten Wassers gemischt. Hierfür werden 50 ml des Konzentrates in einen 1000 ml Standzylinder gegeben und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle sind vorher durch Erwärmen (Wasserbad bei 37 °C) zu lösen. Der verdünnte Waschpuffer ist bei einer Lagerung bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) fünf Tage haltbar.

## 9.3. Herstellung der Dengue-Virus Antigen-Konjugatlösung (ausschließlich für die Detektion von IgM-Antikörpern gegen Dengue-Virus)

Der Inhalt jedes Fläschchens Ag LYO wird mit 2 ml Konjugat Conjugate IgM unter Schwenken (kein Vortexen) gelöst und anschließend für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei Raumtemperatur 3 Stunden stabil.

## 9.4. Vorbereitung der Proben

Die zu untersuchenden Serum- oder Plasmaproben werden vor Testbeginn 1 + 100 mit dem Probenpuffer Diluent verdünnt.

z. B. 10 µl Serum/Plasma + 1 ml Diluent

### **Achtung!**

**Cut-off Kontrolle, Negativkontrolle und Positivkontrolle sind gebrauchsfertig und dürfen nicht verdünnt werden.**

## 9.5. Erste Inkubation

Nach dem Einstecken einer ausreichenden Zahl von Kavitäten in den Halterahmen werden von den verdünnten Seren und gebrauchsfertigen Kontrollen jeweils 100 µl in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert, die Position A1 (Substratleerwert) bleibt frei. Die der Bestimmung (IgG, IgM) entsprechenden Kontrollen sind zu verwenden. Es wird empfohlen die Cut-off Kontrolle in Doppelbestimmung durchzuführen. Die Platte wird 60 Minuten bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert. Dabei sollte der Boden der Kavitäten keinen Kontakt zu gut wärmeleitenden Materialien haben. Die Mikrotiterplatte ist während der Inkubation mit der mitgelieferten Abdeckfolie zu bedecken.

A1	Substratleerwert
B1	Negativkontrolle
C1	Cut-off Kontrolle
D1	Cut-off Kontrolle
E1	Positivkontrolle
F1,G1	Patientenserum 1,2 usw.

## **Achtung!**

**Die Mikrotiterplatte darf nicht in ein kühles Inkubationsbehältnis gestellt werden, das sich erst während der Inkubation auf 37 °C erwärmt. Das Behältnis muss schon vorab an 37 °C adaptiert sein.**

### **9.6. Waschen**

Die Kavitäten sollten in einen Abfallbehälter mit Hypochloritlösung zur Desinfektion entleert werden. Danach wird die Platte auf saugfähigem Papier ausgeklopft, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen. Anschließend wird 3mal mit jeweils 300 µl Waschpuffer gewaschen. Dabei ist nach jedem Waschgang für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen auf einer unbenutzten Stelle des Papiers zu sorgen. Bei Verwendung eines Waschautomaten ist auf die korrekte Einstellung des Gerätes auf den verwendeten Plattentyp zu achten. Nach dem Waschen sollte die Platte auf saugfähigem, sauberem Papier ausgeklopft werden, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen.

### **9.7. Zweite Inkubation**

#### RIDASCREEN® Dengue Virus IgG

Zugabe von 100 µl Konjugat Conjugate IgG in alle Vertiefungen mit Ausnahme der Position A1 (Substratleerwert). Anschließend wird die Platte 30 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubiert. Die Mikrotiterplatte ist während der Inkubation mit der mitgelieferten Abdeckfolie zu bedecken.

#### RIDASCREEN® Dengue Virus IgM µ-capture

Zugabe von 100 µl der hergestellten Dengue Virus Konjugatlösung in alle Vertiefungen mit Ausnahme der Position A1 (Substratleerwert). Anschließend wird die Platte 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Mikrotiterplatte ist während der Inkubation mit der mitgelieferten Abdeckfolie zu bedecken.

### **9.8. Waschen**

3maliges Waschen gemäß Pkt. 9.6.

### **9.9. Dritte Inkubation**

Zugabe von je 100 µl Substrat Substrate in alle Vertiefungen auch in A1 (Substratleerwert). Anschließend wird die Platte 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubiert. Danach wird durch Zugabe von 100 µl Stopp-Reagenz Stop in alle Vertiefungen die Reaktion gestoppt, dadurch erfolgt ein Farbwechsel von blau nach gelb. Nach vorsichtigem Mischen (leichtes Tippen an den Plattenrand) wird die Extinktion in einem Plattenphotometer bei 450 nm gemessen (Referenzwellenlänge  $\geq 620$  nm). Der Abgleich des Nullwertes erfolgt gegen den Substratleerwert (Position A1) innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe des Stopp Reagenzes.



## 10. Qualitätskontrolle - Anzeichen für Reagenzienverfall

Für die Qualitätskontrolle sind bei jeder Testdurchführung Positiv, Negativ und Cut-off Kontrolle mitzuführen. Die Cut-off Kontrolle wird in Doppelbestimmung durchgeführt und der Mittelwert aus den beiden Einzelmessungen gebildet. Der Test ist korrekt verlaufen, wenn die Extinktionswerte (OD) der Kontrollen folgende Kriterien erfüllen:

**Tab. 3:** Kriterien für die Qualitätskontrolle

	OD
Substratleerwert	< 0,100
Negativ Kontrolle	< Cut-off
Cut-off Kontrolle	0,150-1,300
Positiv Kontrolle	> Cut-off

Eine Abweichung von den geforderten Werten kann ebenso wie eine Trübung oder Blaufärbung des farblosen Substrates vor Zugabe in die Kavitäten ein Hinweis auf einen Reagenzienverfall sein.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung Folgendes zu überprüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte (z. B. Kalibrierung)
- Korrekte Testdurchführung
- Visuelle Kontrolle der Kitkomponenten auf Kontamination oder Undichtigkeit; eine bläulich gefärbte Substratlösung darf nicht mehr verwendet werden

Sind nach Testwiederholung die Bedingungen wiederum nicht erfüllt, wenden Sie sich bitte an den Hersteller.

## 11. Auswertung und Interpretation

### 11.1. Berechnung des Proben-Index

1. Der Extinktionsmittelwert der Cut-off Kontrolle wird berechnet.
2. Division der Extinktion der Patientenprobe durch den berechneten Extinktionsmittelwert der Cut-off Kontrolle.

z. B.: Cut-off Kontrolle 1 OD = 0,440  
Cut-off Kontrolle 2 OD = 0,420  
Mittelwert: = 0,430  
Proben OD = 1,591

$$\text{Proben-Index} = \frac{1,591}{0,430} \times 10 = 37$$

**Tab. 4:** Bewertung des Proben-Index

	negativ	grenzwertig	positiv
Proben-Index	< 9	09 – 11	> 11

## 12. Grenzen der Methode

Die RIDASCREEN® Dengue Virus ELISA weisen IgG- bzw. IgM-Antikörper gegen Dengue Virus nach. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe des gemessenen Extinktionswertes und dem Auftreten oder der Schwere klinischer Symptome kann nicht abgeleitet werden. Die erzielten Ergebnisse sind immer in Verbindung mit dem klinischen Bild zu interpretieren.

Ein negatives Ergebnis schließt eine bestehende Infektion nicht aus. Zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion kann die Antikörperbildung noch so gering sein, dass eine Untersuchung hierauf negativ ausfällt. Bei bestehendem klinischem Verdacht sollte deshalb ein Folgeserum untersucht werden.

Generell sollten bei serologischen Untersuchungen zur Verbesserung der diagnostischen Aussage immer zwei aufeinander folgende Seren eines Patienten untersucht werden. Wichtig für die Interpretation eines Befundes ist der Verlauf des Titers.

Ein positives Ergebnis schließt die Anwesenheit anderer infektiöser Erreger als Ursache für eine Erkrankung nicht aus.

Kreuzreaktivitäten mit Antikörpern gegen West-Nil-Virus, andere Flaviviren oder Patientenmaterial mit Rheumafaktoren können nicht ausgeschlossen werden.

### 13. Leistungsmerkmale

**Tab. 5:** Inter-Assay-Varianz (n = 12)

Inter-Assay-Varianz	IgG		IgM	
	U/ml	VK	U/ml	VK
Serum 1	24,9	6,6 %	18,8	6,6 %
Serum 2	48,6	6,7 %	9,0	6,2 %
Serum 3	1,3	13,0 %	5,3	5,8 %

**Tab. 6:** Intra-Assay-Varianz (n = 24)

Intra-Assay-Varianz	IgG		IgM	
	OD	VK	OD	VK
Serum 1	0,539	4,0 %	0,530*	3,2 %*
Serum 2	1,306	3,3 %	1,019	2,4 %
Serum 3	2,579	1,9 %	0,986	2,8 %

\*n=23

**Tab. 7:** Sensitivität und Spezifität







	IgG	IgM
Sensitivität	100 %	100 %
Spezifität	98,0 %	98,5 %

## 14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2017-12-13	Freigabeversion

## 15. Symbolerklärung

### Allgemeine Symbole

	In-vitro-Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

## Testspezifische Symbole

Plate	Mikrotiterplatte
Diluent	Probenpuffer
Wash	Waschpuffer 20x
Control IgG   +	Positivkontrolle IgG
Control IgG   -	Negativkontrolle IgG
Cut-off IgG	Cut-off Kontrolle IgG
Control IgM   +	Positivkontrolle IgM
Control IgM   -	Negativkontrolle IgM
Cut-off IgM	Cut-off Kontrolle IgM
Conjugate IgG	Anti-human Konjugat IgG
Conjugate IgM	Dengue Virus-Konjugat IgM
Ag LYO	Dengue Antigen, lyophilisiert
Substrate	Substrat
Stop	Stopp-Reagenz

## 16. Literatur

1. Kuhn, R.J.; Zhang, W.; Rossmann, M.G.; Pletnev, S.V.; Corver, J.; Lenches, E.; Jones, C.T.; Mukhopadhyay, S.; Chipman, P.R.; Strauss, E.G.; Baker, T.S.; Strauss, J.H. (2002) Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. 108(5):717-725.
2. Mairuhu, A.T.; Wagenaar, J.; Brandjes, D.P.; van Gorp, E.C. (2004) Dengue: an arthropod-borne disease of global importance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 23(6):425-433.
3. Nawa, M.; Yamada, K.I.; Takasaki, T.; Akatsuka, T.; Kurane, I. (2000) Serotype-cross-reactive immunoglobulin M responses in dengue virus infections determined by enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol*. 7(5), 774-777.
4. Peeling, R.W.; Artsob, H.; Pelegrino, J.L.; Buchy, P.; Cardoso, M.J.; Devi, S.; Enria, D.A.; Farrar, J.; Gubler, D.J.; Guzman, M.G.; Halstead, S.B.; Hunsperger, E.; Kliks, S.; Margolis, H.S.; Nathanson, C.M.; Nguyen, V.C.; Rizzo, N.; Vázquez, S.; Yoksan, S. (2010) Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Microbiol*. 8(12 Suppl):S30-38.
5. Rogers, D.J.; Wilson, A.J.; Hay, S.I.; Graham, A.J. (2006) The Global Distribution of Yellow Fever and Dengue. *Adv Parasitol*. 62: 181-220.
6. Whitehorn, J.; Farrar, J. (2010) Dengue. *Br Med Bull*. 95:161-173.
7. Wilder-Smith, A. (2012) Dengue infections in travellers. *Paediatr Int Child Health*. 32 Suppl 1:28-32.
8. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva, World Health Organization, 2009 (WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1).0

