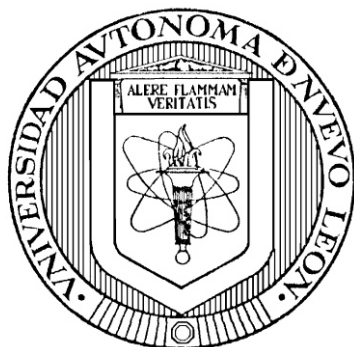


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EMERGENCIA DEL VIRUS CHIKUNGUNYA (CHIKV) EN CHIAPAS, MÉXICO:
TENDENCIAS EN PATRONES EPIDEMIOLÓGICOS E INCRIMINACIÓN DE
VECTORES

POR

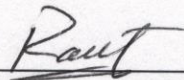
ESTEBAN EDUARDO DÍAZ GONZÁLEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CON ACENTUACIÓN EN
ENTOMOLOGÍA MÉDICA

ENERO, 2018


EMERGENCIA DEL VIRUS DE CHIKUNGUNYA (CHIKV) EN CHIAPAS,
MÉXICO: TENDENCIAS EN PATRONES EPIDEMIOLÓGICOS E
INCRIMINACIÓN DE VECTORES

Dirección de tesis



Dr. Raúl Torres Zapata

Director

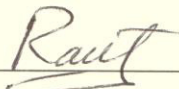


Dr. Ildefonso Fernández Salas

Director externo

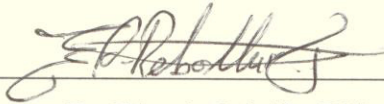
EMERGENCIA DEL VIRUS DE CHIKUNGUNYA (CHIKV) EN CHIAPAS,
MÉXICO: TENDENCIAS EN PATRONES EPIDEMIOLÓGICOS E
INCRIMINACIÓN DE VECTORES

Comité de Tesis



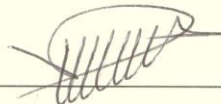
Dr. Raúl Torres Zapata

Presidente



Dr. Eduardo Rebollos Téllez

Secretario



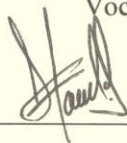
Dr. Roberto Mercado Hernández

Vocal



Dr. Feliciano Segovia Salinas

Vocal



Dra. Susana Favela Lara

Vocal

*“Aquel que conoce a las personas es razonable.
Aquel que se conoce a sí mismo es iluminado.
Aquel que puede conquistar a los enemigos es fuerte.
Aquel que se ha conquistado a sí mismo es poderoso.”*

Lao-Tse, Tao Te King

*“ [...] vi el
Aleph, desde todos los puntos, vi en el Aleph la tierra, y en la tierra otra vez el
Aleph y en el Aleph la tierra, vi mi cara y mis vísceras, vi tu cara, y sentí vértigo
y lloré, porque mis ojos habían visto ese objeto secreto y conjetural, cuyo
nombre usurpan los hombres, pero que ningún hombre ha mirado: el
inconcebible universo.”*

Jorge Luis Borges, El Aleph

DEDICATORIA

Al gran arquitecto universal y su infinitud que siempre es causa de asombro

A mi familia

Mi esposa Alicia Dorantes Delgado, quien con su amor incondicional y su fortaleza me han hecho ser un mejor ser humano. Te amo.

Mi madre Leticia González García, quien me dio la vida y nunca ha dudado de mí y me ha apoyado en todo lo que me he propuesto.

A mi difunto padre, José Díaz Martínez, en donde sea que estés.

A mis amigos cercanos

A todos ustedes por su sincera amistad y su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ildelfonso Fernández Salas por haberme brindado su confianza para ingresar al Doctorado en Ciencias en Entomología Médica y su enorme apoyo para la elaboración de este trabajo y dirección del mismo. Además, estoy muy agradecido por compartirme su amistad y su sabiduría.

Al Dr. Raúl Torres Zapata por haberme apoyado durante la dirección interna de este trabajo y, además, de su amplia apertura y disposición para ayudarme en todo lo que he requerido para la realización de este trabajo.

Al resto del comité de tesis: Dr. Eduardo Rebollar Téllez, Dr. Roberto Mercado Hernández, Dr. Feliciano Segovia Salinas y Dra. Susana Favela Lara, quienes a lo largo del doctorado me han retroalimentado con sus valiosos comentarios durante la elaboración de este trabajo.

Al grupo de UTMB liderado por el Dr. Scott Weaver que me apoyó durante mi estancia en Galveston, Texas en la elaboración de este trabajo: Tiffany Kautz, Jesse Erasmus, Rose Langsjoen y Rubin Cheng. Thank you all!

Al personal del Centro Regional de Investigación en Salud Pública que apoyaron en la planeación del proyecto, colectas, muestreos y trabajo de laboratorio: Dr. Rogelio Danis Lozano, M.C. Iliana Rosalía Malo García, Eufronio Diaz, QFB José Domingo y M.C. José Nettel. De antemano muchas gracias por su apoyo.

A la M.C. Alicia Dorantes Delgado, por su invaluable apoyo en las salidas de campo, separación e identificación taxonómica de los vectores. Gracias por estar en esos momentos de arduo trabajo.

A todos mis colegas de la UANL que me han apoyado en la elaboración de este trabajo: Dra. Rosa María Sánchez Casas, Dra. Samanta del Río Galván, QBP Alejandro Gaitán Burns y al cDr. Wilfredo Arque Chunga. Aprecio mucho su amistad y su enorme apoyo tanto logístico como motivacional.

A los doctores del hospital “Dr. Roberto Nettel”, la Dra. Sandra Caballero-Sosa y al Dr. Luis Manuel Salgado Corsantes, por su enorme contribución en el diagnóstico clínico de los pacientes y así poder hacer los análisis epidemiológicos pertinentes.

Al grupo del Hospital “Ciudad Salud” por su enorme apoyo para la realización de los análisis de laboratorio de los casos incluidos en el estudio: Dra. Karina Trujillo Murillo, Dr. Jesús Sepúlveda Delgado y al Dr. Luis Miguel Canseco Ávila

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su apoyo para la realización de mis estudios de Doctorado con especialidad en Entomología Médica (Becario No. 290688).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) que a través del proyecto “Un nuevo indicador para incrementar la sensibilidad del actual sistema de vigilancia epidemiológico del dengue basado en casos clínicos: detección de DENV en mosquitos domiciliarios *Aedes aegypti* utilizando la técnica de RT-PCR” (Número 214952) financió este trabajo.

Al Institute for Human Infections and Immunity y al McLaughlin Fellowship Fund de la University of Texas Medical Branch que apoyaron en el financiamiento de este trabajo.

Y a todos aquellos que han contribuido a realizar este trabajo que por olvido no he podido mencionar. Sin olvidar el agradecimiento a todos los pacientes por haber participado a este estudio y de esta manera poder contribuir un poco a la creación de conocimiento científico en beneficio de la humanidad.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.....	3
Virología.....	3
Cuadro clínico	4
Mecanismo de transmisión	6
Vector del virus CHIKV <i>Aedes aegypti</i>	8
Competencia vectorial y su relación con los linajes de CHIKV	13
Epidemiología	15
Origen y brotes previos al 2004.....	15
Reemergencia en África y Asia a partir del 2004.....	15
Emergencia en América: Casos importados y transmisión autóctona en 2013	17
Emergencia en México: Transmisión autóctona, 2014-2015	18
JUSTIFICACIÓN	20
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVOS	22
Objetivo General	22
Objetivos específicos.....	22
CAPÍTULO 1: Caracterizar el patrón epidemiológico del CHIKV al inicio del brote a partir de la búsqueda activa de pacientes febriles en Suchiate, Chiapas, frontera sur de México.....	23
RESUMEN.....	23
INTRODUCCIÓN.....	24
MATERIAL Y MÉTODOS	26
Área y población de estudio.....	26
Consideraciones de bioética.....	27
Muestreo y encuesta epidemiológica básica.....	27
Diagnóstico serológico y molecular mediante las pruebas de ELISA y qRT-PCR..	28
Análisis estadístico	29
RESULTADOS	31
DISCUSIÓN.....	35
CAPÍTULO 2: Incriminar al mosquito <i>Aedes aegypti</i> como vector de CHIKV en el estado de Chiapas, México.....	37

RESUMEN	37
INTRODUCCIÓN.....	38
MATERIAL Y MÉTODOS	40
Área de estudio	40
Colecta e identificación de mosquitos	41
Diagnóstico molecular mediante la técnica de qRT-PCR	41
Cultivo celular para medir efecto citopático.....	42
Secuenciación del fragmento E1/E2 y análisis filogenético.....	42
Análisis estadístico	43
RESULTADOS	44
DISCUSIÓN.....	47
CAPÍTULO 3: Describir los síntomas clínicos y análisis de laboratorio de pacientes agudos y convalecientes del hospital “Dr. Roberto Nettel”, Tapachula, Chiapas, México.	49
RESUMEN	49
INTRODUCCIÓN.....	50
MATERIAL Y MÉTODOS	52
Área y población de estudio.....	52
Consideraciones de bioética.....	52
Muestreo y encuesta epidemiológica básica	53
Análisis de laboratorio clínico	53
Diagnóstico serológico y molecular mediante las técnicas de ELISA y qRT-PCR .	54
Análisis de datos	55
RESULTADOS	56
DISCUSIÓN.....	62
CONCLUSIONES	66
Capítulo 1	66
Capítulo 2	66
Capítulo 3	66
PERSPECTIVAS	68
BIBLIOGRAFÍA	69
ANEXOS	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos epidemiológicos básicos del brote de CHIKV en las localidades de Ciudad Hidalgo y el ejido “La Libertad”, municipio de Suchiate, Chiapas, Octubre- Noviembre 2014.....	32
Tabla 2. Colección de Mosquitos en 147 viviendas de Ciudad Hidalgo, Suchiate, Chiapas	44
Tabla 3. Resumen de colectas de mosquitos hembra <i>Ae. aegypti</i> en la localidad de Ciudad Hidalgo, Suchiate, Chiapas, octubre-diciembre, 2014.	45
Tabla 4. Datos demográficos de los 95 pacientes confirmados a la infección por CHIKV en el hospital “Dr. Roberto Nettel”, Tapachula, Chiapas, diciembre 2014-junio 2015 ...	57
Tabla 5. Características clínicas de los 95 pacientes confirmados atendidos por el hospital “Dr. Roberto Nettel”, Tapachula, Chiapas, diciembre 2014-junio 2015.....	59
Tabla 6. Anormalidades bioquímicas, electrolíticas y hematológicas de 95 pacientes confirmados a CHIKF, Hospital “Dr. Roberto Nettel”, diciembre 2014-junio 2015, Tapachula, Chiapas.	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Genoma de los alphavirus como el virus chikungunya	3
Figura 2. A. Estructura del virión del virus chikungunya. B. Reconstrucción en alta resolución bajo microscopía crioelectrónica del virión CHIKV, esquematizando las glicoproteínas E1 y E2, la cápside, la bicapa lipídica y el ARN. C. Predicción de la estructura de las glicoproteínas de envoltura del virión.....	4
Figura 3. Presentación clínica de la fase aguda de la fiebre chikungunya.....	5
Figura 4. Mosquitos vectores del virus chikungunya.....	7
Figura 5. Modelo de transmisión del virus chikungunya.....	7
Figura 6. Periodos de incubación extrínseco e intrínseco del virus chikungunya (PAHO, 2011).	8
Figura 7. Ciclo biológico del mosquito <i>Aedes aegypti</i>	9
Figura 8. Árbol filogenético que representa la relación que existe entre los cuatro linajes del virus chikungunya	13
Figura 9. Distribución geográfica del virus chikungunya en el Viejo Mundo hasta el año 2012.....	17
Figura 10. Distribución geográfica de los casos autóctonos de CHIKV en las diferentes regiones del Continente Americano, 2015	19
Figura 11. Flujo migratorio en el municipio de Suchiate, frontera México-Guatemala, a través del río Suchiate	25
Figura 12. Área de estudio de la vigilancia de febriles en las comunidades fronterizas de Ciudad Hidalgo y el ejido “La Libertad”, en el municipio de Suchiate, Chiapas.	26
Figura 13. Localidades de estudio durante la vigilancia activa del virus CHIKV en el municipio de Suchiate, Chiapas.	28
Figura 14. Firma de consentimiento informado, llenado de encuesta epidemiológica y toma de muestra sanguínea a pacientes probables a la fiebre chikungunya	28
Figura 15. Síntomas clínicamente más visibles: poliartralgia edematosa (fotos superiores) y exantema (fotos inferiores).....	33
Figura 16. Gráficas de distribución por edades de casos positivos de CHIKV, Suchiate Chiapas, octubre-noviembre 2014.	34
Figura 17. Distribución por sexo de los casos confirmados de CHIKV en las comunidades de Ciudad Hidalgo y el ejido “La Libertad”, Suchiate, Chiapas, octubre-noviembre del 2014.....	34
Figura 18. Área de estudio del muestreo de mosquitos adultos en la localidad de Ciudad Hidalgo.....	40

Figura 19. Colección de mosquitos en los domicilios de las colonias de Ciudad Hidalgo, Suchiate, Chiapas, octubre-diciembre, 2014.....	41
Figura 20. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en las secuencias parciales de la región E1/E2 de CHIKV aisladas de mosquitos infectados de Ciudad Hidalgo, Suchiate, Chiapas, octubre 2014.	46
Figura 21. Área de estudio del estudio observacional de corte de pacientes infectados a CHIKV atendidos en el hospital “Dr. Roberto Nettel”, noviembre 2014-junio 2015	56
Figura 22. Enrolamiento de pacientes de los pacientes sospechosos a CHIKF en el hospital “Dr. Roberto Nettel”, diciembre 2014-junio 2015, Tapachula, Chiapas.....	57
Figura 23. Valores de los análisis de laboratorio para la función hepática y renal, glucosa, lípidos, electrolitos, biometría hemática, diferencial de leucocitos, pruebas de coagulación y marcador de inflamación de 95 casos de CHIKF confirmados enrolados en este estudio.	60

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. DICTÁMEN DEL COMITÉ DE BIOÉTICA DEL INSP	85
ANEXO 2. CONSENTIMIENTOS INFORMADOS.....	86
ANEXO 3. FORMATO DE ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO	91
ANEXO 4. EXTRACCIÓN DE ARN CON EL ESTUCHE COMERCIAL ZR-96 (Zymo Research).....	92
ANEXO 5. TÉCNICA DE qRT-PCR UTILIZANDO EL ESTUCHE COMERCIAL TaqMan RNA-to-Ct 1-step (Applied Biosystems)	93
ANEXO 6. PROCEDIMIENTO DE LA ELISA PARA LA DETECCIÓN DE IgM ANTI-CHIKV (Inbios).....	95
ANEXO 7. PROTOCOLO PARA EL ENSAYO DE EFECTO CITOPÁTICO (CPE)..	98
ANEXO 8. PROTOCOLO DE SECUENCIACIÓN PARCIAL PARA LAS REGIONES VIRALES E1 / E2.....	101
ANEXO 9. EXTRACCIÓN DE ARN UTILIZANDO EL ESTUCHE QIAMP VIRAL RNA	103
ANEXO 10. PROTOCOLO PARA LA QRT-PCR TIEMPO REAL DEL CDC	105
ANEXO 11. COMPILACIÓN DE LOS DATOS CLÍNICOS Y ANÁLISIS DE LABORATORIO MÁS RELEVANTES DURANTE LOS DIFERENTES BROTES DE CHIKV ALREDEDOR DEL MUNDO	107

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A/G: Relación Albúmina / Globulina.

ADE: Amplitud de Distribución Eritrocitaria.

ALP: Alkaline Phosphatase (Fosfatasa Alcalina).

ArboNet: National Arboviral Surveillance System (Sistema de Vigilancia Nacional de Arbovirus).

ARN (RNA): Ácido ribonucleico.

ARNasa: Ribonucleasa.

AST: Aspartato aminotransferasa.

BD: Bilirrubina directa.

BI: Bilirrubina indirecta.

BT: Bilirrubina Total.

CDC: Center of Disease Prevention and Control (Centro de Prevención y Control de Enfermedades).

CDD: Conserved Domain Database (Base de datos de dominios conservados).

CENAPRECE: Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades.

CHCM: Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media.

CHIKF: Fiebre chikungunya.

CHIKV: Virus chikungunya.

CONEVAL: Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social.

CPE: Cytopathic effect (Efecto citopático).

CRISP: Centro Regional de Investigación en Salud Pública.

DENF: Fiebre por dengue.

DENV: Virus del dengue.

DGE: Dirección General de Epidemiología.

DVBD: Division of Vector-Borne Diseases (División de Enfermedades transmitidas por Vector).

E1-A226V: Mutación de la proteína E1 en la posición 226, donde se intercambia una alanina (A) por una valina (V).

ECDC: European Center of Disease Prevention and Control (Centro de Prevención y Control de Enfermedades Europeo).

ECSA: Este-Centro-Sur Africano.

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid (Ácido etilendiaminotetraacético).

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima).

FAM: 6-carboxifluoresceína.

GGT: Gamma-Glutamiltransferasa.

HCM: Hemoglobina Corpuscular Media.

IgM: Inmunoglobulina M.

INAFED: Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal.

IOL: Indian Ocean Lineage (Linaje del Océano Índico).

ISC: Días entre inicio de síntomas y consulta.

ISSSTE: Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado.

Kb: kilobases.

LDH: Lactato Deshidrogenasa.

MOH: Ministry of Health (Ministerio de Salud).

nsp1: Non-structural protein 1 (Proteínas no estructural 1).

nsp2: Non-structural protein 2 (Proteínas no estructural 2).

nsp3: Non-structural protein 3 (Proteínas no estructural 3).

nsp3: Non-structural protein 4 (Proteínas no estructural 4).

PAHO: Pan American Health Organization (Organización Panamericana de la Salud).

PCR: Proteína C-Reactiva

pE1: Proteína de envoltura 1.

pE2: Proteína de envoltura 2.

PT: Proteína Total.

qRT-PCR: Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real Cuantitativa).

TP: Tiempo de Protrombina.

TPT: Tiempo Parcial de Tromboplastina.

VCM: Volumen Corpuscular Medio.

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

VPM: Volumen Plaquetario Medio.

RESUMEN

El virus chikungunya (CHIKV) es un arbovirus de la familia *Togaviridae*, género *Alphavirus*, transmitido principalmente por los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Esta enfermedad, que en un inicio emergió en Tanzania en 1952, se fue diseminando al resto del mundo hasta que en el año 2013 se reporta el primer caso de esta enfermedad en el continente americano, específicamente en la Isla de San Martín. Ante el avance progresivo hacia Centroamérica y Sudamérica, se mantuvo la alerta en la frontera sur de México ante la eventual entrada del virus a nuestro país. Por esta razón, se tuvo como objetivo estudiar la emergencia de CHIKV en el municipio fronterizo de Suchiate y la región del Soconusco del estado de Chiapas, para encontrar patrones epidemiológicos básicos durante la fase inicial del brote e incriminar qué vectores estuvieron transmitiendo este arbovirus. En el mes de octubre del 2014, se encuentra el primer brote causado por CHIKV en las localidades de Ciudad Hidalgo y el ejido “La Libertad”, donde se analizaron 65 pacientes, siendo positivos a CHIKV 59 (90.8%). Además, se realizaron muestreos de mosquitos en las mismas viviendas de la localidad de Ciudad Hidalgo en el mismo momento donde se muestrearon los casos positivos encontrándose una tasa de infección en *Ae. aegypti* de 32.26/1,000 mosquitos (IC 95% = 20.06–49.62). Después de comprobar el ingreso de CHIKV a nuestro país e incriminar al vector *Ae. aegypti*, se prosiguió a realizar un estudio observacional de corte en el hospital “Dr. Roberto Nettel”, en el cual se incluyeron 112 casos probables a fiebre chikungunya, con la finalidad de describir los principales síntomas observados y verificar si existe alguna alteración en los parámetros hemáticos y bioquímicos de los pacientes durante la infección. Luego de confirmar 95 casos (84.8%) los principales síntomas observados fueron fiebre, poliartralgias severas, exantema (rash), dolor de cabeza y náuseas. Adicionalmente, los parámetros de análisis de laboratorio arrojaron que los pacientes presentaron principalmente leucopenia, linfopenia, altos niveles de transaminasas, alta PCR y alta LDH. Este trabajo permitió generar más conocimiento epidemiológico acerca de esta enfermedad emergente que puede mejorar el diagnóstico clínico de ésta y conocer mejor su mecanismo de transmisión en nuestro país.

ABSTRACT

Chikungunya virus (CHIKV) is an arbovirus belonging to family *Togaviridae*, genus *Alphavirus*, transmitted mainly by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. This disease emerged in Tanzania in 1952 and then disseminated worldwide until in 2013 the first case of CHIKV was reported in the American Continent, specifically in the Saint Martin Island. The progressive advance towards Central and South America has alarmed the Mexican south border before the eventual entrance of this arbovirus to our country. For this reason, the aim of this work was study the emergence of CHIKV in the border municipality of Suchiate and Soconusco Region from Chiapas State to find basic epidemiological patterns during the outbreak onset and incriminate the vectors involved during CHIKV transmission. In October 2014 the first CHIKV outbreak was identified in the localities of Ciudad Hidalgo and el ejido “La Libertad” where 65 patients were analyzed being positive 59 (90.8%). In addition, mosquito collections were performed in the same households during the outbreak in Ciudad Hidalgo. An infection rate of 32.26/1,000 mosquitoes (95% IC = 20.06–49.62) was found in *Ae. aegypti* populations from Ciudad Hidalgo. After proving CHIKV entrance to Mexico and incriminate *Ae. aegypti* as a CHIKV vector, an observational cross-sectional study was carried out in the hospital “Dr. Roberto Nettel” located in Tapachula which 112 probable cases of CHIKV were included. The aim was describing the main symptoms and verify if any clinical and/or biological feature was altered during CHIKV infection. A total of 95 cases (84.8%) were confirmed to CHIKV infection observing mainly the following symptoms: fever, polyarthralgia, rash, headache and nausea. Furthermore, the biological features showed that patients exhibited leukopenia, lymphopenia, high levels of transaminases, PCR and LDH. This study contributed to epidemiological knowledge of chikungunya fever and may improve clinical diagnosis of this arboviral disease and know better the transmission mechanism in our country.

INTRODUCCIÓN

El virus chikungunya (CHIKV) es un virus de ARN monocatenario, cadena positiva, no segmentado de aproximadamente 11.8 kb de longitud, perteneciente al género *Alphavirus*, familia *Togaviridae* (Weaver *et al.*, 2005). Este virus produce la fiebre chikungunya (CHIKF), una enfermedad febril acompañado de artralgias incapacitantes en las extremidades superiores e inferiores junto con una erupción cutánea generalizada. El fuerte dolor e hinchazón se focaliza en las manos, muñecas, tobillos y pies. Las artralgias pueden durar desde semanas hasta meses, en alrededor del 12% de la población infectada (Caglioti *et al.*, 2013). Esta enfermedad arboviral es transmitida principalmente por *Aedes aegypti* y secundariamente por *Ae. albopictus*, aunque una mutación en la posición A226V de la región viral E1 hace mejor vector a este último (Tsetsarkin *et al.*, 2007)

La CHIKF se identificó por primera vez en 1952 en un brote en las planicies de Tanzania (Robinson, 1955). En los años sesenta, fueron descritos más brotes esporádicos en Asia (Halstead *et al.*, 1969). Pero a partir del año 2004, el CHIKV ha expandido su distribución geográfica mundial, provocando epidemias sostenidas de magnitud sin precedentes en Asia y África, con tasas de ataque hasta del 70% (Sergon *et al.*, 2008)

En el continente americano, durante el periodo del 2006-2013, habían sido detectados casos importados de personas que regresaban a Estados Unidos provenientes de zonas afectadas, la mayoría de Asia (Fisher & Staples, 2014). Hasta finales del año 2013, se registra el primer caso autóctono en el continente en la Isla de San Martín (Omarjee *et al.*, 2014). Desde ese entonces hasta Julio del 2014, la transmisión local se había reportado en 26 países del caribe, cuatro en Sudamérica, tres en Centroamérica y uno en Norteamérica (Florida), con un estimado de 651,000 casos (Fisher & Staples, 2014; PAHO, 2017). Para noviembre del 2014, México a través de la Secretaría de Salud, declaró la emergencia epidemiológica por el virus Chikungunya (CHIKV) al confirmar un caso autóctono en el estado de Chiapas (CENAPRECE, 2014).

En el año 2015, la fiebre CHIKV causó en América 575,281 casos, concentrándose principalmente en República Dominicana y el resto del Caribe, El Salvador, Colombia, Venezuela y Guatemala. En ese año, México confirmó 11,577 casos autóctonos y 20 importados (PAHO, 2015).

La preocupación ante la inminente dispersión de CHIKV al resto del país se explica por su elevada tasa de ataque, que impactará directamente en el sistema de salud y en la economía nacional. Pero principalmente porque en 30 Estados presentan abundantes poblaciones domiciliarias del mosquito *Ae. aegypti* y en al menos 8 de ellos también hay *Ae. albopictus* (Casas-Martínez & Torres-Estrada, 2003; Hernández-Ávila *et al.*, 2013; Salomón-Grajales *et al.*, 2012; Villegas-Trejo *et al.*, 2010) . El anterior escenario epidemiológico descrito potencializa las condiciones adecuadas para provocar epidemias como en República Dominicana, Guadalupe, Haití, El Salvador, entre otros.

Este trabajo pretende caracterizar el perfil epidemiológico a la infección por CHIKV e incriminar qué vectores están transmitiendo el CHIKV en la frontera Sur de México. Primero se realizó un estudio exploratorio durante la entrada de CHIKV a nuestro país en el municipio de Suchiate, Chiapas, para describir el brote inicial en esta comunidad. Luego, se colectaron mosquitos en los sitios donde hubo casos sospechosos de CHIKV para la incriminación de vectores. Finalmente, se realizó un estudio de corte a partir de pacientes sospechosos a la infección por CHIKV en el hospital “Dr. Roberto Netel”, ubicado en el municipio de Tapachula, Chiapas, para describir la sintomatología clínica y resultados de análisis de laboratorio para buscar algún biomarcador que facilite el diagnóstico clínico de la infección por CHIKV. Los resultados de esta investigación serán transferidos al Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE) para su futura inclusión en la NOM-032-SSA2-2014.

ANTECEDENTES

Virología

El virus CHIKV pertenece al género *Alphavirus*, familia *Togaviridae*. El genoma de CHIKV consiste en una molécula lineal de ARN de cadena sencilla y sentido positivo de aproximadamente 11.8kb. El extremo 5' del genoma tiene una capucha 7-metilguanosa, mientras que el extremo 3' está poliadenilado. Las cuatro proteínas no estructurales (nsP1-nsP4), requeridas para la replicación viral, están codificadas en los primeros dos tercios del genoma del extremo 5', mientras que las proteínas estructurales son colineares con el otro tercio en el extremo 3'. (Simizu *et al.*, 1984; Weaver *et al.*, 2005) (Figura 1).

La nsP1 está involucrado en la síntesis de la cadena negativa y en la unión de la capucha (Salonen *et al.*, 2005). La nsP2 tiene actividad ARN helicasa, ARN trifosfatasa y proteínasa y está involucrada en la inhibición de la transcripción de la célula hospedera. La nsP3 forma parte de la unidad de replicación y la nsP4 es la ARN polimerasa dependiente de ARN (Garmashova *et al.*, 2007).

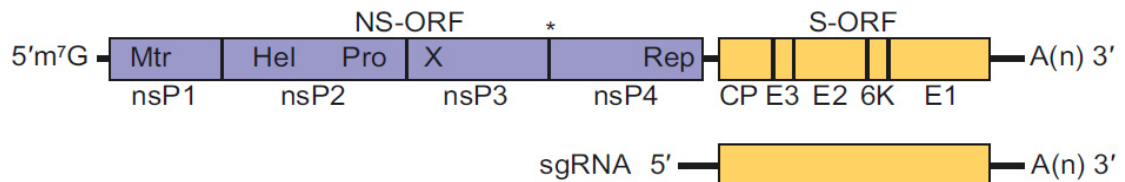


Figura 1. Genoma de los alphavirus como el virus chikungunya, donde se observa el ARN genómico 49S en la parte superior y el ARN subgenómico 26S en la parte inferior (King *et al.*, 2012)

Estas proteínas en conjunto se ensamblan para formar el complejo de replicación, el cual sintetiza las cadenas negativas, que a su vez sirven de molde para la producción de ARN subgenómico 26S y genómico 49S. El ARN subgenómico dirige la expresión de la poliproteína precursora de las proteínas estructurales (C-pE2-6K-pE1), que es procesada por su actividad autocatalítica serin proteasa (Griffin, 2007).

La proteína C es liberada, y las glicoproteínas pE2 y E1 son modificados post-traduccionalmente en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi antes de ser transportados a la membrana plasmática (Schlesinger & Schlesinger, 1986) donde

mantienen una asociación cercana uno con otro, formando un heterodímero trimérico con estructura de espiga (Anthony & Brown, 1991; Paredes *et al.*, 1993). Aquí pE2 se escinde en E2 (involucrado en la unión a receptor) y E3 (dirige el correcto plegamiento de pE2 y su subsecuente asociación con E1).

El ensamblaje viral es promovido por la unión de la nucleocápside viral al ARN viral y al reclutamiento de las glicoproteínas de envoltura asociadas a la membrana plasmática. La partícula viral ensamblada, con un núcleo icosaédrico, emerge de la membrana celular (Schwartz & Albert, 2010) (Figura 2).

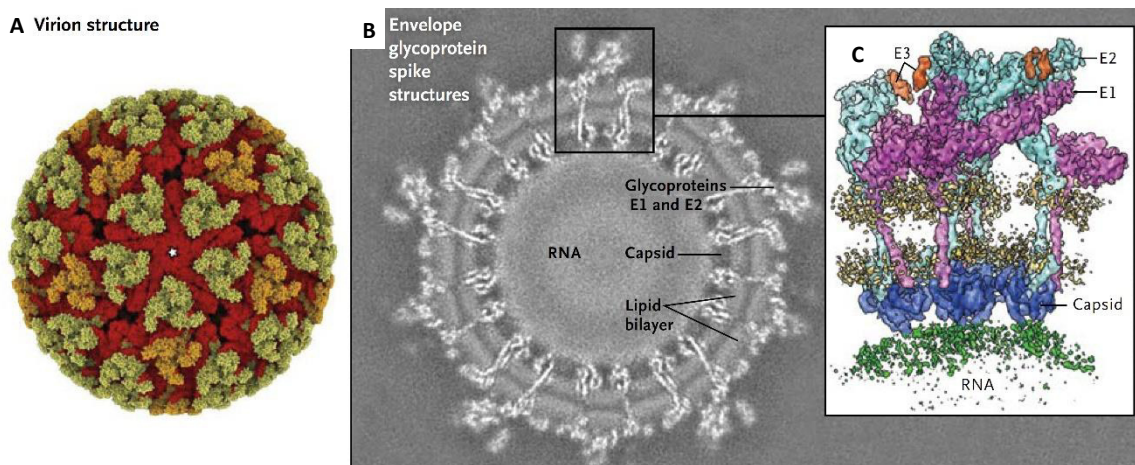


Figura 2. A. Estructura del virión del virus chikungunya. B. Reconstrucción en alta resolución bajo microscopía crioelectrónica del virión CHIKV, esquematizando las glicoproteínas E1 y E2, la cápside, la bicapa lipídica y el ARN. C. Predicción de la estructura de las glicoproteínas de envoltura del virión (Weaver & Lecuit, 2015).

Cuadro clínico

Después de la infección con CHIKV, hay un periodo de incubación que dura entre 2-4 días (rango de 1-12 días) (Lam *et al.*, 2001). El inicio de la enfermedad es abrupto, con fiebre alta ($\geq 39^{\circ}\text{C}$), dolor de cabeza, dolor de espalda, mialgias, erupción maculopapular y poliartalgias; éstas pueden ser intensas, afectando principalmente las extremidades (tobillos, muñecas, falanges) y también en las articulaciones grandes (Hochedez *et al.*, 2006; Quatresous, 2006; Saxena *et al.*, 2006) (Figura 3). La gran mayoría de los individuos infectados muestran síntomas clínicos, dejando casos asintomáticos desde casi el 25%, y en algunos brotes valores tan bajos de hasta 3% (Queyriaux *et al.*,

2008; Sissoko *et al.*, 2008). Alrededor del 40-50% de los casos presentan una erupción maculopapular pruriginosa predominantemente en el tórax. La presentación clínica puede también involucrar edema facial y, en niños, una erupción bullosa con pronunciado desprendimiento, petequias localizadas y gingivorragia (Brighton *et al.*, 1983; Fourie & Morrison, 1979). Los marcadores biológicos de inflamación (tasa de sedimentación eritrocítica y proteína C reactiva) son normales o moderadamente elevadas (Kennedy *et al.*, 1980). La iridociclitis y retinitis son las manifestaciones oculares más comunes asociadas con CHIKV. Todas las manifestaciones oculares tienen un curso benigno con una completa resolución y preservación de la visión. La retinitis muestra una resolución gradual de un periodo de 6 a 8 semanas (Mahendradas *et al.*, 2008).



Figura 3. Presentación clínica de la fase aguda de la fiebre chikungunya (PAHO, 2011).

Las manifestaciones neurológicas, las cuales habían sido reportadas infrecuentemente en las primeras epidemias, se han ido documentando cada vez más durante las más recientes epidemias. Estas complicaciones neurológicas incluyen meningoencefalitis, mieloneuropatía, síndrome de Guillain-Barré, parálisis aguda flácida y parálisis (Sharda & Meena, 2007; Singh *et al.*, 2008; Wielanek *et al.*, 2007). La mortalidad por CHIKV se ha llegado a asociar en una baja cantidad de casos, pero una relación causal aún no se ha establecido. Cuando la mortalidad ocurre, condiciones

subyacentes como la diabetes, hipertensión y obesidad parecen representa los factores de riesgo más comunes (Economopoulou *et al.*, 2009).

Aunque la mayoría de los pacientes se recuperan completamente de la enfermedad en cuestión de semanas sin ninguna secuela residual, la persistencia de los síntomas es notada en algunos pacientes. Estos síntomas incluyen fatiga, dolor articular incapacitante, tenosinovitis y/o poliartritis edematosa. En un pequeño porcentaje de casos, los síntomas han sido reportados que duran por años; hasta el 64% de los pacientes reportaron rigidez articular con o sin dolor por más de un año después del inicio de la infección, con 12% reportando síntomas de 3 a 5 años después (Borgherini *et al.*, 2007; Brighton *et al.*, 1983; Sissoko *et al.*, 2008).

Mecanismo de transmisión

El virus CHIKV es transmitido principalmente por el mosquito *Ae. aegypti* en las regiones tropicales y subtropicales del mundo y en menor medida el mosquito *Ae. albopictus*, principalmente en regiones templadas de África y Asia (Caglioti *et al.*, 2013) (Figura 4). Otro vector incriminado es el mosquito *Ae. hensilli*, quien ha sido protagonista en la transmisión de CHIKV en la isla de Yap, en los Estados Federados de Micronesia (Savage *et al.*, 2015). El modelo de transmisión de CHIKV propuesto por Weaver y Forrester (2015) incluye tres ciclos de transmisión que están profundamente interrelacionados: 1) ciclo enzoótico entre primates no humanos y mosquitos *Aedes* spp. selváticos, 2) Zona de emergencia, donde el virus se transmite a los humanos por picaduras de mosquitos *Aedes* spp de entornos selváticos y 3) ciclo epidémico, entre humanos y mosquitos *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* y *Ae. hensilli* (Figura 5).

Los mosquitos adquieren el virus a partir de la picadura a un huésped virémico. Después de un periodo promedio de incubación extrínseca de 10 días, el mosquito es capaz de transmitir el virus a un huésped susceptible, como a un ser humano. En los humanos picados por un mosquito infectado, los síntomas de enfermedad aparecen generalmente después de un período de incubación intrínseca de tres a siete días (rango: 1–12 días). Después de este periodo, el humano virémico es capaz infectar a mosquitos susceptibles (PAHO, 2011) (Figura 6).



Figura 4. Mosquitos vectores del virus chikungunya: *Aedes aegypti* (izquierda) obsérvese el patrón de las escamas blancas del tórax en forma de una lira. *Aedes albopictus* (derecha), obsérvese el patrón de las escamas blancas del tórax en forma de una línea recta (Foto del Laboratorio de Entomología Médica de Florida, Universidad de Florida, 1999)

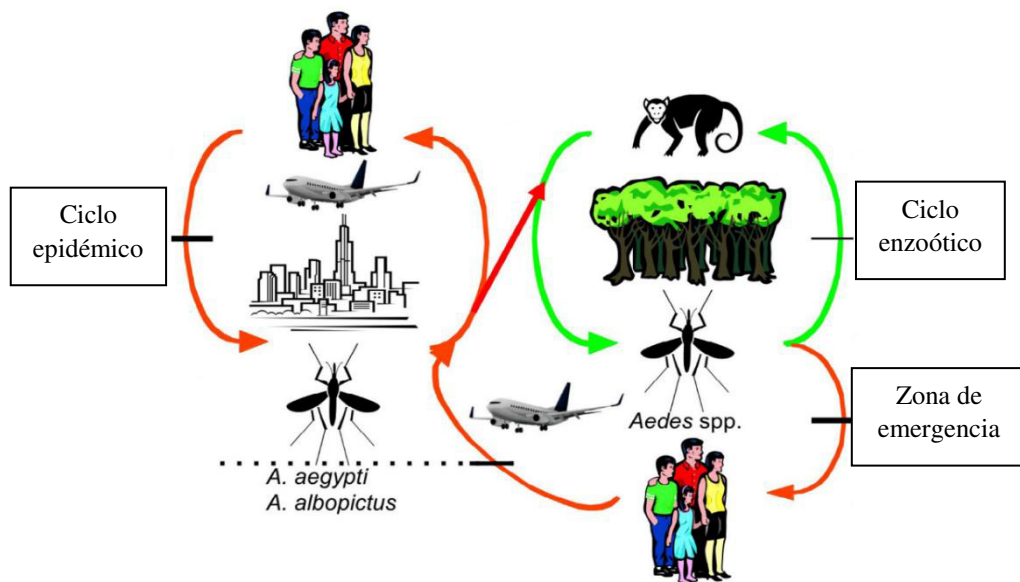


Figura 5. Modelo de transmisión del virus chikungunya. El virus CHIKV es transmitido naturalmente en entornos selváticos entre primates no humanos y *Aedes spp.*, pero los humanos que viven o laboran cerca de estos entornos, son infectados a través de picaduras de *Aedes spp.* selváticos. Finalmente, estos humanos infectados en las zonas de emergencia trasladan el virus a entornos urbanos para que se pueda dar el ciclo epidémico donde *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* fungen como vectores (Weaver & Forrester, 2015)

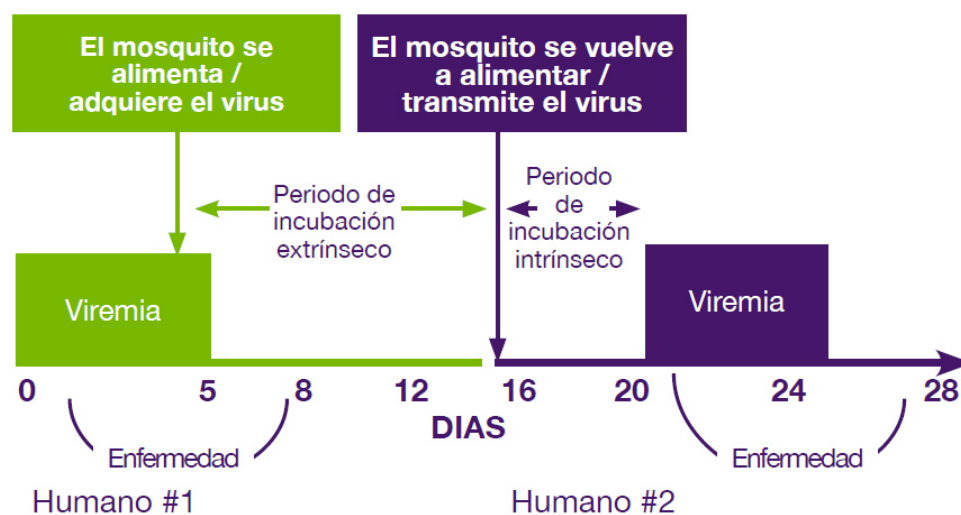


Figura 6. Periodos de incubación extrínseco e intrínseco del virus chikungunya (PAHO, 2011).

Vector del virus CHIKV *Aedes aegypti*

Es de dominio universal el conocimiento que *Ae. aegypti* tiene una distribución cosmopolita y estable entre los trópicos y zonas subtropicales; tiene, además, una preferencia doméstica en su ciclo de vida, por lo que su adaptabilidad es muy grande hacia los diferentes escenarios que el humano hace en sus viviendas (especie sinantrópica); muy difundido en áreas con características urbanas, aunque también se encuentra en áreas rurales (Kraemer *et al.*, 2015). Se distribuye en forma permanente entre los 35° de latitud norte y 35° de latitud sur, pero puede extenderse hasta los 45° norte y hasta los 40° sur, donde coinciden con una isoterma de 10 °C en verano, la altitud promedio en donde se encuentra es por debajo de los 1,200 metros, aunque se ha registrado alturas de alrededor de los 2,245m en la Ciudad de México y 2,600m en Bolivia (Aquino Rojas *et al.*, 2016; Kuri-Morales *et al.*, 2017). Sus condiciones mínimas de sobrevivencia y su resistencia a diferentes eventos adversos, como la desecación y la inanición, lo hace un mosquito de presencia muy común y continua, así como de elevadas densidades poblacionales durante las épocas lluviosas con temperatura y humedad estables (Christophers, 1960; Nelson, 1983).

La especie es predominantemente doméstica, prolifera en recipientes artificiales o naturales que se encuentran en las viviendas o en sus alrededores, únicamente las hembras

son hematófagas, se alimentan de sangre humana o de los animales domésticos que detectan por estímulos visuales, movimientos, tamaño, olor, humedad, temperatura, concentración de CO₂, entre otros. Esta sangre les es necesaria para desencadenar la maduración de sus óvulos y de esta forma puedan producir los huevos. Rara vez se encuentran a más de 100 metros de la vivienda humana, pero dependerá mucho de la distribución de los criaderos disponibles, ya que, si son escasos, el rango de vuelo puede ser mucho mayor (Reiter *et al.*, 1995; WHO, 2009)

Los cambios morfológicos que tiene que experimentar *Ae. aegypti* a través de toda su vida son complejos, el hecho de tener que vivir en el agua cierto tiempo y luego desplazarse al ambiente aéreo requieren desde aparatos bucales diferentes (masticador como larva y picador chupador como adulto hembra) hasta formas de locomoción totalmente opuestas; movimientos natatorios de su cuerpo en el agua y presencia de un par de alas para vuelo horizontal, vertical y a diferente velocidad. Las fases del ciclo de vida de *Ae. aegypti* son: huevo, larva (tres mudas con sus cuatro estadios respectivos), pupa y adulto diferenciado en sexos como hembra y macho (Nelson, 1983) (Figura 7).

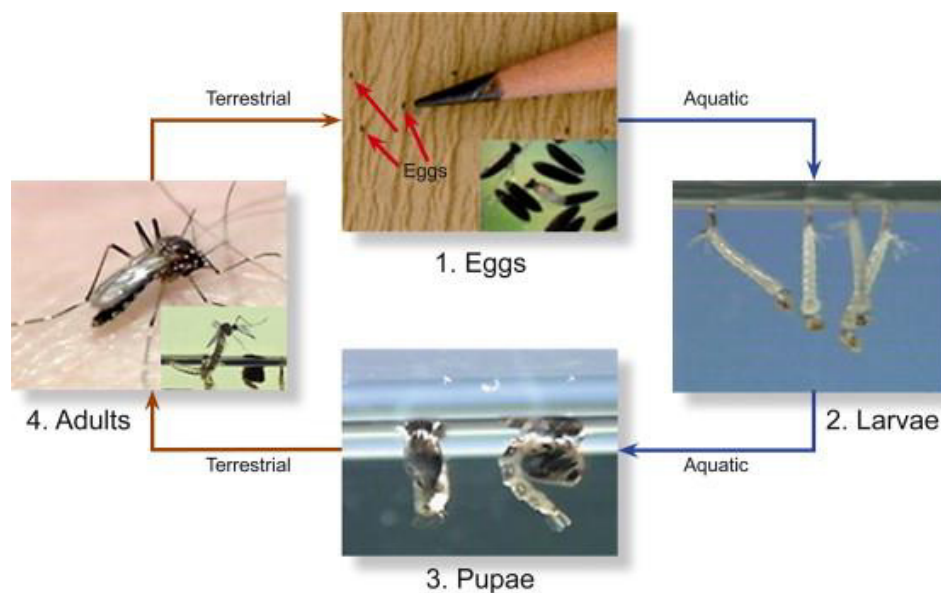


Figura 7. Ciclo biológico del mosquito *Aedes aegypti* (Urdaneta-Marquez & Failloux, 2011)

Los huevos de *Ae. aegypti* miden aproximadamente un milímetro de longitud, son depositados individualmente al ras del agua quedando adheridos a las paredes del recipiente. En el momento de la postura los huevos son blancos, cambian rápidamente a color negro (Nelson, 1983).

La fecundación ocurre al momento de la postura del huevo, debido a que los espermatozoides en la hembra se almacenan inmediatamente después de ocurrir la cópula en una estructura denominada espermateca, el óvulo al pasar por el oviducto al nivel de esta estructura se fusiona con un espermatozoide iniciando el desarrollo embrionario que transcurre en alrededor de 48 horas si el ambiente es húmedo y cálido, si la temperatura es baja se prolonga hasta por cinco días (Nelson, 1983).

Completo el desarrollo embrionario, el embrión dentro del huevo es capaz de resistir largos períodos de desecación por meses o hasta por más de un año, al volver a tener contacto con el agua la acción bacteriana de la materia orgánica disminuye la tensión de oxígeno estimulando la eclosión en tan sólo alrededor de unos 15 minutos (Nelson, 1983). La resistencia de los embriones de *Ae. aegypti* a la desecación es uno de los principales obstáculos para los programas de control, puesto que no están consideradas medidas ovicidas, además permiten la posibilidad de ser transportados a grandes distancias en recipientes secos. Por lo tanto, la eliminación exitosa de los adultos y de larvas en una localidad, no imposibilita la reinfestación a través de los huevos que se encuentren en estado latente (Nelson, 1983)

Los huevos requieren la disminución del oxígeno disuelto en el agua del criadero como un estímulo para la eclosión. El oxígeno disuelto comienza a reducirse por varios factores: a) La caída violenta de las gotas de lluvia y el movimiento que produce, b) Al paso de las horas, la presencia de microorganismos es también activada, éstos inician sus procesos de alimentación, respiración, etc. Sin embargo, un exceso de materia orgánica tiene efecto opuesto, las aguas pestilentes son rechazadas por la hembra *Ae. aegypti* (Clements, 1992; Fernández-Salas, 2009)

Las larvas y pupas de *Ae. aegypti* son acuáticas, y como en la mayoría de los insectos holometábolos (con metamorfosis completa), los estadios larvales son el período de crecimiento y desarrollo. Las larvas se alimentan prácticamente durante todo el día de cualquier materia orgánica acumulado en las paredes y en el fondo del recipiente, utilizan sus sedas bucales que tienen forma de abanico (Clements, 1992)

El primer estadio larval es la forma que eclosiona del huevo, transcurre en uno o dos días que ha dedicado a alimentarse y a crecer; ocurre la muda y surge el segundo

estadio. Inmediatamente después de la muda la cápsula cefálica y el sifón son blandos y transparentes, al extenderse permite el subsecuente desarrollo, se endurecen y oscurecen. Después del segundo estadio, la cápsula cefálica y el sifón no cambian de tamaño, el tórax y el abdomen crecen considerablemente durante cada fase (Clements, 1992)

La duración del desarrollo larval está en función de la temperatura, la disponibilidad de alimento y la densidad de larvas en el criadero. En condiciones óptimas, el período larval desde la eclosión hasta la pupación puede ser de cinco días, pero por lo regular ocurre de siete a catorce días. Los primeros tres estadios se desarrollan rápidamente, el cuarto se toma más tiempo aumentando considerablemente su tamaño y peso, en condiciones de baja temperatura o escasez de alimento el cuarto estadio puede prolongarse por varias semanas. Las larvas y las pupas de los machos se desarrollan más rápido que las hembras para garantizar la fecundación (Clements, 1992)

Las pupas no se alimentan. Su función es la metamorfosis del estadio larval al adulto. Las pupas de los mosquitos son diferentes a las de otros insectos holometabólos por presentar reacciones inmediatas a estímulos externos tales como vibraciones y cambios en la intensidad de la luz, desplazándose activamente por todo el criadero. Cuando están inactivas flotan en la superficie, esta propiedad facilita la emergencia del adulto. El estadio de pupa dura aproximadamente dos o tres días, emergiendo alrededor del 88% de los adultos en cuestión de 48 horas (Fernández-Salas, 2009)

Al emerger de la exuvia de pupa, el mosquito adulto se posa sobre la pared del criadero durante minutos para permitir el endurecimiento del exoesqueleto y de las alas, en los machos en este tiempo también ocurre rotación de 180° de sus genitales. Antes de 24 horas ambos sexos están listos para el apareamiento, alrededor del 58% de las hembras nulíparas son inseminadas antes de su primera alimentación sanguínea, un 17% durante y el 25% es inseminada entre la segunda alimentación y la primera oviposición; los machos rondan como voladores solitarios aunque es más común que lo hagan en grupos pequeños (Kettle, 1995) atraídos por los mismos huéspedes vertebrados que las hembras. Esto facilita el apareamiento que por lo general se efectúa durante el vuelo, también ocurre sobre superficies verticales u horizontales; el macho sujeta el ápice del abdomen de la hembra con su terminalia e inserta su aedeagus en el receptáculo genital de la hembra. La

bursa copulatrix de la hembra se llena de esperma que pasa de inmediato a la espermateca en menos de dos minutos. Una inseminación es suficiente para fecundar todos los huevos que la hembra produzca en toda su vida. El macho es atraído por el sonido emitido de las alas de la hembra durante el vuelo, una vez alimentada de sangre ocurren pocos apareamientos, debido en gran parte a los movimientos más rápidos de sus alas que compensan el aumento de peso, como consecuencia deja de estimular a los machos (Nelson, 1983)

Las hembras se alimentan de sangre de cualquier vertebrado, por sus hábitos domésticos muestran marcada predilección por el humano. Vuelan en sentido contrario al viento, desplazándose mediante lentas corrientes de aire, siguen los olores y gases emitidos por el huésped (CO₂), al estar cerca utilizan estímulos visuales para localizarlo mientras sus receptores táctiles y térmicos las guían hacia el sitio donde se posan. La alimentación sanguínea les proporciona las proteínas necesarias para la maduración de las ovariolas y por consecuencia, la producción de los huevos. Los picos de alimentación ocurren principalmente durante el día registrando mayor actividad en la primera hora de haber amanecido y una hora antes del anochecer (Fernández-Salas, 2009)

Las partes bucales del macho no están adaptadas para chupar sangre, se alimentan de carbohidratos de cualquier fuente accesible como frutos o néctar de flores que satisface sus requerimientos energéticos, las hembras también se alimentan de esta misma fuente como complemento indispensable (Kettle, 1995)

Es común que después de cada alimentación sanguínea la hembra desarrolle un lote de huevos, la primera generación de óvulos requiere por lo menos dos alimentaciones sanguíneas para su maduración, aunque *Ae. aegypti* suele alimentarse más de una vez entre cada postura, es decir por alimentaciones múltiples, especialmente si es perturbada antes de estar completamente satisfecha con dos a tres miligramos de sangre, mientras se alimenta desecha gotas de un fluido claro. Las hembras alimentadas pueden desarrollar y oviponer hasta 100 huevos. Hay un umbral en la distensión abdominal del estómago que estimula el desarrollo de los ovarios, por lo que una alimentación escasa produce menos huevos por lote y si es muy reducida no se producen (Kettle, 1995)

Estos linajes muestran distintas eficacias de transmisión intra e inter-especies de los mosquitos *Aedes* (Lambrechts *et al.*, 2011; Vega-Rúa *et al.*, 2014). Durante la epidemia de CHIKV del 2005-2006 en la región del Océano Índico, el linaje IOL tuvo una sustitución de una alanina por una valina en la posición 226 de la glicoproteína de envoltura E1 (E1-A226V), que le permitió ser transmitido más eficientemente por *Ae. albopictus* (Tsetsarkin *et al.*, 2007). Desde el 2009, mutaciones adaptativas adicionales en la glicoproteína E2 E2-L210Q y E2-K252Q han sido descritas en las cepas del linaje IOL obtenidos de Kerala, India, con una incrementada transmisión en *Ae. albopictus*, comparada con cepas parentales solo con la mutación E1-A226V (Tsetsarkin *et al.*, 2014).

Las poblaciones de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* colectadas a lo largo de América han reportado ser susceptibles a los linajes IOL y Asiático de CHIKV (Vega-Rúa *et al.*, 2014). Por lo tanto, tanto en zonas templadas como en zonas tropicales y subtropicales del continente americano están en riesgo de mayor transmisión de CHIKV. En general, *Ae. albopictus* es mejor que *Ae. aegypti* transmitiendo la cepa CHIKV_0621 perteneciente al linaje IOL aislado del brote de la isla de La Réunion en 2006 (Voss *et al.*, 2010), mientras que *Ae. aegypti* es mejor transmitiendo la cepa CHIKV_NC del linaje asiático y la cepa CHIKV_115 del linaje IOL sin la sustitución E1-A226V (Powers & Logue, 2007).

El rol específico de estos vectores en cada región del continente americano es aún desconocido. Pero se puede inferir que el vector principal es muy probable que sea *Ae. aegypti*, puesto que hasta este momento no han aparecido la mutación E1-A226V y ni otras mutaciones epistáticas que aumentan la capacidad de ser transmitido por *Ae. albopictus* (Díaz-Quñonez *et al.*, 2015; Lanciotti & Valadere, 2014; Teixeira-Nunes *et al.*, 2015). Sin embargo, la evolución de CHIKV es impredecible y las mutaciones adaptativas para *Ae. albopictus* pueden aparecer en cualquier momento, creando un nuevo vector competente en el continente (Tsetsarkin *et al.*, 2014). Estos previos antecedentes de vectores competentes a CHIKV, la presencia de los linajes Asiáticos y IOL en el continente (Weaver & Lecuit, 2015) y ambos vectores lejos de ser contralados, pone un escenario poco alentador para el mantenimiento de las epidemias de miles de casos de CHIKV durante los siguientes meses y/o años.

Epidemiología

Origen y brotes previos al 2004

El virus chikungunya fue descubierto por primera vez en 1952, después de un brote de una enfermedad parecida al dengue en el sureste de Tanzania. El nombre de la enfermedad proviene del idioma makonde, que significa “hombre encorvado” (Robinson, 1955). Desde ese entonces hasta el 2004, se registraron cuatro epidemias importantes en África y el subcontinente Indio: en los brotes de Tailandia en los años de 1958-1960 y 1962-1964, se estimaron aproximadamente 40,000 y 44,000-72,000 casos, respectivamente (Halstead *et al.*, 1969; Rudnick & Hammon, 1962); en el sureste de la India en el brote de 1962-1965, confirmaron 273 casos pero se registraron seroprevalencias de hasta el 40% (Myers *et al.*, 1965) y finalmente en el brote de la República Democrática del Congo en 1999-2000, alrededor de 40,000 casos fueron estimados (Muyembe-Tamfum *et al.*, 2003). Otros brotes esporádicos y menos importantes se han registrado en varios países de África Central y el Sureste de Asia previo al 2004. Hasta ese momento, tres genotipos habían circulado en las regiones que llevan su nombre: East Central South Africa (ECSA) (África Central, del Este y Sur); Asiático y Africano Occidental, éste descrito en ciclos enzooticos (Volk *et al.*, 2010; Weaver, 2014)

Reemergencia en África y Asia a partir del 2004

A partir del 2004, se registra un brote importante de CHIKF en Kenia y Comoros que durara hasta el 2005 con más de 250,000 casos (Sergon *et al.*, 2007, 2008). Después que la epidemia en Comoros disminuyera a finales del 2005, hubo un resurgimiento inesperado de la actividad en la isla francesa de La Réunion. Con el inicio de la temporada de lluvias en diciembre, un incremento considerable de casos ocurrió a inicios del 2006 cuando se estuvieron reportando 40,000 casos semanales. Este brote representó el punto de inflexión en la reemergencia de este virus en tres aspectos: 1) Divergencia de un nuevo linaje a partir del genotipo ECSA: genotipo Océano Índico (IOL), 2) la aparición de la mutación en la región E1 (alanina a valina en la posición 226), el cual incrementó la capacidad del virus en ser transmitido por *Ae. albopictus* (Vazeille *et al.*, 2007; Volk *et al.*, 2010) y 2) la dispersión de este nuevo genotipo hacia el sureste asiático y Europa, siendo la primera vez que se reporta la transmisión local en este continente. La epidemia

en La Réunion resultó en un estimado de 266,000 casos, pudiéndose explicar esta enorme cantidad de casos a que *Ae. albopictus* era el vector predominante en esta región y fue favorecido por la mutación E1-A226V (Vazeille *et al.*, 2007). A partir de esta epidemia, numerosos individuos virémicos fueron identificados en múltiples países después que viajeros a esta isla se infectaran y regresaran a sus hogares mientras seguían infecciosos. Particularmente, varios países europeos incluyendo Francia, Italia y España (donde el mosquito *Ae. albopictus* estaba establecido) documentaron casos importados (Soumahoro *et al.*, 2010). El virus también fue exportado desde La Réunion a la India donde se estimó que ocurrieron 1.3 millones de casos solo durante el primer año de la epidemia que inició en el 2006 (Mavalankar *et al.*, 2008). En 2007, el virus fue introducido a Italia vía un viajero infectado de la India resultando en ese momento en una transmisión autóctona en la región de la Ravenna. El número de casos fue bajo (aproximadamente 300) y el brote se limitó por el inicio del invierno combinado con un programa local de erradicación rápida del mosquito, pero la transmisión localizada de CHIKV en una región subtropical dejó grandes preocupaciones para otras regiones no previamente expuestas a CHIKV pero con la presencia de los vectores epidémicos (Rezza *et al.*, 2007). La epidemia continuó dispersándose más en 2009 y 2010 con un gran brote de casi 50,000 personas en el sur de Tailandia (Rianthavorn *et al.*, 2010) así como también se reportó la transmisión local por primera vez en China (Wu *et al.*, 2012).

La actividad continuó en 2011, pero interesantemente no solo como una extensión de la pandemia en curso, sino con al menos dos brotes independientes. El primero fue un pequeño agregado de cuatro casos en Nueva Caledonia. Mientras el número de casos hallado fue limitado, esta detección fue importante debido a que fue determinado el genotipo Asiático, indicando claramente la emergencia independiente del virus desde un ciclo distinto (Dupont-Rouzeyrol *et al.*, 2012). El otro brote independiente fue detectado en el mismo año en la República del Congo donde el genotipo ECSA (East Central South Africa) fue encontrado (Kelvin, 2011). Ambos genotipos Asiático y ECSA fueron detectados en 2012 con más brotes de CHIKV en las Filipinas, Camboya, Papua Nueva Guinea, Malasia, Bután y el Medio Oriente (Yemen) por primera vez (Zayed *et al.*, 2012). El número de casos continuó incrementándose en 2013 con un registro de casos locales Singapur (992), casos importados en Australia (127) y la emergencia del genotipo Asiático

en los Estados Federados de Micronesia (Yap) afectando a más de 900 individuos (Roth *et al.*, 2014; Singapore MOH, 2013). Las secuencias de los aislados de Yap fueron virtualmente idénticos a aquellos de las Filipinas y China en 2012, demostrando el movimiento del genotipo Asiático del este de Asia al Pacífico occidental que así continuó hasta finales del 2013 (Lanciotti & Valadere, 2014). En la figura 9, se muestra la distribución geográfica del CHIKV en el Viejo Mundo hasta el año 2012, previo a la emergencia del virus en el Nuevo Mundo a partir del año 2013.

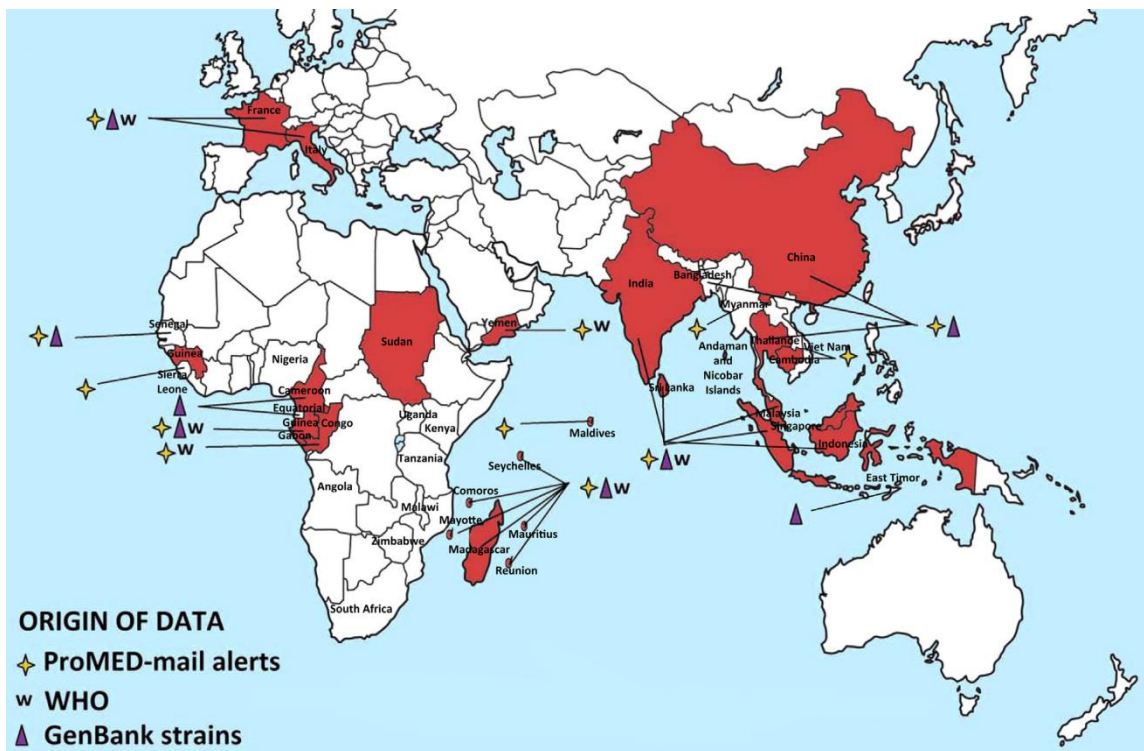


Figura 9. Distribución geográfica del virus chikungunya en el Viejo Mundo hasta el año 2012. En color rojo se muestran los países que han reportado casos autóctonos con alertas del ProMED, la Organización Mundial de la Salud y el GenBank (Thiberville, Moyon, *et al.*, 2013)

Emergencia en América: Casos importados y transmisión autóctona en 2013

Previo al año 2006, cuando la vigilancia de CHIKV fue puesta en marcha en Estados Unidos a través de la plataforma ArboNet, CHIKV era ignorado en América puesto que no era una enfermedad endémica del continente. Solo tres casos importados, en los años 1996, 2001 y 2005 cada uno, habían sido reportados por el CDC. Después del 2006 hasta el 2010, en los Estados Unidos se habían detectado un total de 106 casos importados. La mayoría de ellos había tenido un antecedente de viaje a países endémicos con brotes en marcha como la India y otros países del sureste asiático (Gibney *et al.*,

2011). En el mismo 2006, el European Control Disease Center (ECDC) reporta 9 casos importados en territorios franceses en América provenientes de La Réunion, también territorio francés: 3 en Martinica, 3 en Guadalupe y 3 en Guyana (Ledrans *et al.*, 2007). A raíz de estos antecedentes, la Organización Panamericana de la Salud (OPS), con el apoyo de la División de Enfermedades Transmitidas por Vectores de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (DVBD, CDC), formó un grupo de trabajo y convocó a una reunión en Lima, Perú, los días 21–23 de julio de 2010, para crear la guía “Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus chikungunya en las Américas”. La finalidad de esta guía era mejorar los conocimientos sobre esta amenaza y brindar las herramientas necesarias que permitan establecer las estrategias más adecuadas para prevenir la importación de CHIKV a la Región, o para su control en caso de introducción (PAHO, 2011).

Después del 2010 hasta el 2013, el continente americano siguió recibiendo casos importados de CHIKV en Estados Unidos y Brasil, con un total de 115 y 3, respectivamente. La mayoría de estos viajeros provenían de la India, Indonesia y Filipinas que tenían brotes en marcha (Albuquerque *et al.*, 2012; Chaves *et al.*, 2012; Lindsey *et al.*, 2015).

Finalmente, en diciembre del 2013, se reportan los primeros dos casos autóctonos de CHIKV en el continente americano en la isla francesa de San Martín (PAHO, 2013). A partir de entonces, los casos de CHIKV se incrementaron de manera alarmante, dejando en el año 2014 un total de 1,118,763 casos sospechosos, de los cuales solo se confirmaron 25,459 (Pan American Health Organization, 2015). En el año 2015, las epidemias de CHIKV continuaron en todo el continente y dejaron un total de 693,489 casos sospechosos y 37,480 confirmados (PAHO, 2016a) (Figura 8). Todo parece indicar que CHIKV ha llegado para quedarse y continuar produciendo brotes anualmente de manera endémica, como el caso de DENV.

Emergencia en México: Transmisión autóctona, 2014-2015

El primer caso de CHIKF en México fue importado en mayo del 2014, proveniente de una mujer de 39 años que había asistido a un evento deportivo en las islas del Caribe (Rivera-Ávila, 2014). Posteriormente, el primer caso de CHIKF autóctono fue de un

infante de 8 años, reportado el 7 de noviembre del 2014 en Arriaga, Chiapas (Cenaprece, 2014). Para final del año 2014, CHIKV había causado un total de 155 casos, principalmente en el estado de Chiapas (DGE, 2015). En el siguiente año, se reportaron 11 577 casos de CHIKF, distribuidos principalmente en los estados de Veracruz (17.3%), Yucatán (14.1%), Guerrero (14.4%), Michoacán (13.9%), Oaxaca (10.3%), Colima (8.5%) y Chiapas (8.1%) mientras que los demás casos (13.4%) se distribuyeron en el resto del país excepto en los estados de Baja California, Ciudad de México, Tlaxcala y Zacatecas. (DGE, 2015a) (Figura 10).



Figura 10. Distribución geográfica de los casos autóctonos de CHIKV en las diferentes regiones del Continente Americano, 2015. Nótese en el caso de México, la transmisión se extendió a 28 estados de la República, con excepción de Tlaxcala, Ciudad de México, Zacatecas y Baja California (PAHO, 2016b).

JUSTIFICACIÓN

Ante la emergencia de una nueva enfermedad arboviral, es importante describir de manera más profunda las características del brote para ampliar el conocimiento clínico de esta enfermedad en nuestro país. Conocer el rol de *Ae. aegypti* como vector permitirá reconocer su importancia como el principal blanco en las estrategias de control de vectores. Además, este virus tiene una capacidad adaptativa que permite ser transmitido por el mosquito invasivo *Ae. albopictus*, que cada vez se dispersa a mayores latitudes y longitudes del país. Adicionalmente, seguir el trazo evolutivo de este virus permitirá conocer su origen y su potencial distribución a otras regiones del país.

HIPÓTESIS

La frontera Sur de México, específicamente en el municipio de Suchiate, Chiapas, será la puerta de entrada del virus chikungunya, ya que en esta localidad hay altas densidades del mosquito *Aedes aegypti* que servirán como vectores de este arbovirus. Además, esta enfermedad se irá diseminando dentro del estado de Chiapas, ocasionando brotes a lo largo de la región del Soconusco, donde los síntomas predominantes serán la fiebre con dolores articulares intensos. Adicionalmente, se podrán relacionar parámetros de análisis de laboratorio que permitirán conocer en una fase inicial las alteraciones hemáticas y bioquímicas, y de esta manera se pueda mejorar el diagnóstico clínico.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar la emergencia del virus chikungunya (CHIKV) identificando las tendencias en patrones epidemiológicos e incriminación de vectores en el estado de Chiapas, México.

Objetivos específicos

1. Caracterizar el patrón epidemiológico del CHIKV al inicio del brote a partir de la búsqueda activa de pacientes febriles en Suchiate, Chiapas, frontera sur de México
2. Incriminar al mosquito *Aedes aegypti* como vector de CHIKV en el estado de Chiapas, México.
3. Describir los síntomas clínicos y análisis de laboratorio de pacientes agudos y convalecientes del hospital “Dr. Roberto Nettel”, Tapachula, Chiapas, México.

CAPÍTULO 1: Caracterizar el patrón epidemiológico del CHIKV al inicio del brote a partir de la búsqueda activa de pacientes febriles en Suchiate, Chiapas, frontera sur de México

RESUMEN

A partir del 2004, el virus chikungunya ha tenido una expansión importante desde el continente africano y asiático hacia las islas del Pacífico y para que finalmente en el año 2013, este arbovirus emergió en el continente americano. Durante el año 2014, la rápida diseminación hacia en Centro y Sur América, ha encendido las alarmas en México ante la eventual entrada de CHIKV por la frontera sur de México. Por esta razón, se tuvo como objetivo realizar una vigilancia activa de febriles a lo largo del municipio de Suchiate, Chiapas, para buscar pacientes sospechosos a la infección por CHIKV durante los meses de octubre-noviembre del 2014. Un total de 86 pacientes sospechosos a tener CHIKV fueron incluidos en el estudio, solicitándoles una muestra de sangre para el diagnóstico de la enfermedad. Solamente se analizaron 65 de ellas, porque las restantes tuvieron algún dato faltante o las muestras estuvieron hemolizadas y/o lipémicas. A partir de estos pacientes, se lograron confirmar 59 (90.8%), siendo positivos 16 de ellos por qRT-PCR y 43 por ELISA IgM. La migración pudo haber jugado un rol clave en la introducción de CHIKV en nuestro país, ya que cinco (8.5%) de los pacientes visitaron en las últimas dos semanas el país de Guatemala, que meses antes había reportado casos autóctonos de CHIKV. Los principales síntomas observados fueron la fiebre, poliartralgia, cefalea y exantema. Este estudio permitió detectar pacientes febriles un mes antes del reporte oficial por CENAPRECE en noviembre del 2014 y sirvió de base para futuros estudios epidemiológicos que permitan conocer el comportamiento clínico de esta infección arboviral.

INTRODUCCIÓN

Después de la emergencia de CHIKV en la isla de San Martín al final del año 2013 (Omarjee *et al.*, 2014), el patrón de dispersión del virus probablemente incluyó a Anguila, San Bartolomé, Martinica, Islas Vírgenes Británicas y Guadalupe, y unos meses después, al resto de las islas del Caribe (Cauchemez *et al.*, 2014). En el año 2014, todo el Caribe reunió 837,530 casos con una tasa de incidencia de 1898.5 por cada 100,000 habitantes. Los países más afectados fueron República Dominicana, Martinica, Guadalupe, Haití y Puerto Rico. En el siguiente año, los casos disminuyeron considerablemente a 18,625 con una tasa de incidencia de 41.4 por cada 100,000 habitantes siendo 45.8 veces menor al año anterior (PAHO, 2016). La explicación más probable de la magnitud explosiva de los casos en el inicio del brote y después una reducción abrupta en el siguiente año pudiera deberse a la reducción de la población susceptible después de la primera ola de casos.

Durante el brote, el linaje asiático de CHIKV es el único que estuvo circulando en el Caribe desde su introducción. Las secuencias virales de este linaje han sido obtenidas de pacientes quienes residían en las Islas Vírgenes Británicas y de Trinidad y Tobago siendo ambas cercanamente relacionadas (Lanciotti & Valadere, 2014; Sahadeo *et al.*, 2015). Una teoría que puede explicar el origen del linaje asiático en las Américas es que CHIKV pudo haber sido introducido por el movimiento de turistas infectados y/o personas infectadas relacionadas al comercio marítimo de Asia. Meses antes del brote del 2014, el 27.5% del turismo reportado en el Caribe fue proveniente de China y Filipinas (Khan *et al.*, 2014). Además, los puertos del Caribe han servido como una intersección del comercio marítimo del Este-Oeste uniendo Asia, América, Europa y el Medio Este (Pinnock & Ajagunna, 2012).

Después de seis meses que estuvo circulando el virus CHIKV en el Caribe, los primeros ocho casos autóctonos en la América continental, específicamente en El Salvador, fueron oficialmente reportadas en junio del 2014. Un mes después, Venezuela anunció un brote de CHIKV con 30 casos autóctonos. Para septiembre del mismo año, la epidemia alcanzó Colombia y Brasil reportándose en ambos países 42 y dos casos autóctonos, respectivamente. Una mayor diseminación continuó en el resto de Centro y Suramérica durante el 2014. Los casos en total que se reportaron en el año 2014 en Centro

y Suramérica fueron 262,264 y 438,863, respectivamente, siendo los países con más casos Brasil, Colombia y Venezuela (PAHO, 2016). La transmisión de CHIKV por el linaje asiático también ha sido reportado en Panamá, Nicaragua, Colombia y Brasil (Balmaseda *et al.*, 2016; Mattar *et al.*, 2015; Teixeira Nunes *et al.*, 2015) siendo todos muy relacionados con la cepa de las Islas Vírgenes Británicas.

Una de las posibles explicaciones sobre la rápida diseminación del virus CHIKV en la América continental y su ingreso a México a finales del 2014 es el rol que tienen los movimientos migratorios, tanto legales como ilegales, ya sea por cuestiones comerciales y/o por búsqueda de mejores oportunidades laborales. El constante movimiento migratorio en la frontera sur México-Guatemala hace esta región vulnerable ante el ingreso de enfermedades arbovirales emergentes (Figura 11). Específicamente en Guatemala, se reportaron un total de 473 casos autóctonos, solo confirmándose 49 de ellos antes de noviembre del 2014 (PAHO, 2014).



Figura 11. Flujo migratorio en el municipio de Suchiate, frontera México-Guatemala, a través del río Suchiate (Foto tomada por el autor, 2014)

Por las razones previamente dichas, se inició un estudio exploratorio en los meses de septiembre a noviembre del 2014 en el municipio fronterizo de Suchiate, Chiapas, para la búsqueda de pacientes febriles para caracterizar la epidemiología básica y realizar la detección del virus CHIKV. Es importante mencionar que este estudio inició previo al reporte oficial del CENAPRECE que fue hasta el mes de noviembre del 2014.

MATERIAL Y MÉTODOS

Área y población de estudio

El estudio de vigilancia activa de febriles se realizó en el municipio fronterizo de Suchiate, Chiapas. Se ubica en la Llanura Costera del Pacífico, predominando el relieve plano. Sus coordenadas geográficas son 14° 41"N y 92° 09"O. Limita al norte con el municipio de la Frontera Hidalgo, al sur con el océano Pacífico, al oriente con la República de Guatemala y al poniente con el municipio de Tapachula. Su extensión territorial es de 236.79 km² que representa el 0.80% de la superficie del estado y su altitud es de 20 msnm. El clima es cálido subhúmedo con lluvias en verano y su vegetación es selva baja (INAFED, 2010). En este municipio, se seleccionaron dos localidades fronterizas para llevar a cabo el estudio: Ciudad Hidalgo y el ejido “La Libertad” (Figura 12).

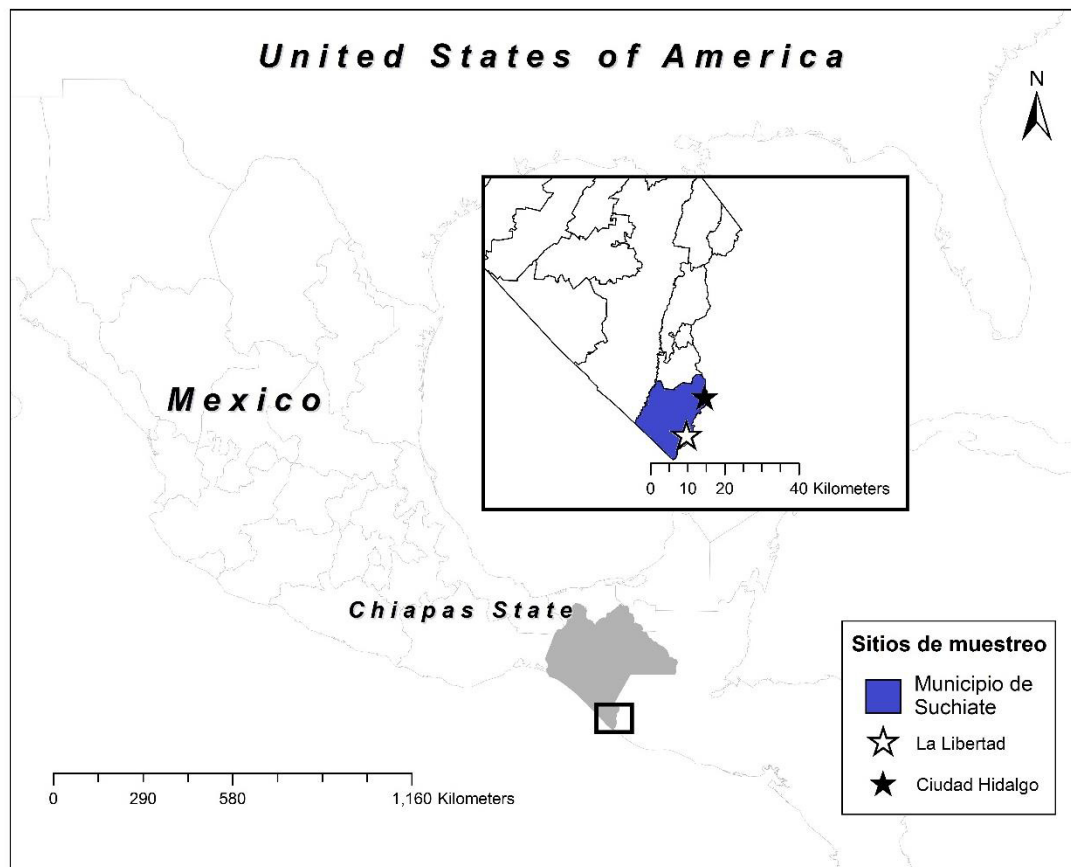


Figura 12. Área de estudio de la vigilancia de febriles en las comunidades fronterizas de Ciudad Hidalgo y el ejido “La Libertad”, en el municipio de Suchiate, Chiapas.

En el censo del 2010, la población de este municipio era de 35,056 habitantes, y según la encuesta intercensal del 2015 la población aumentó a 38,797 habitantes. Este municipio tiene un rezago social medio y con un 81.2% de su población en situación de pobreza. Además, el 13.5% y el 15.3% de la población carece de agua entubada y sistema de drenaje, respectivamente (CONEVAL, 2015, 2017).

Consideraciones de bioética

Este estudio formó parte del protocolo “Emergencia del virus de chikungunya (CHIKV): tendencias en patrones epidemiológicos, incriminación de vectores, y filogenia de variantes genéticas en Chiapas, México” aprobado por las comisiones de bioética, bioseguridad e investigación del Instituto Nacional de Salud Pública (Proyecto #1312 y aprobación #1738) (Anexo 1). A los pacientes se les invitó a participar voluntariamente al estudio, firmando un consentimiento informado (en caso de menores por sus padres o tutores) (Anexo 2), en donde se especificó claramente los objetivos del estudio y los beneficios que aportaría su participación, así como los pequeños inconvenientes que pudiera tener una toma de muestra sanguínea.

Muestreo y encuesta epidemiológica básica

Durante los meses de octubre a noviembre del 2014, se inició la vigilancia activa visitando los hogares buscando pacientes febriles en Ciudad Hidalgo y estableciendo un centro centinela en la clínica médica “Guadalupe” del ejido “La Libertad”, que a través del comisariado ejidal se notificó a la población con síntomas de fiebre y dolor articular que visitaran la clínica para dar una muestra de sangre (Figura 13).

La inclusión de los pacientes al estudio fue si cumplieron con algún síntoma de la definición de probable caso de CHIKF: fiebre mayor de 38°C y/o la presencia de poliartralgias no explicadas por otra condición médica (PAHO, 2011). Tras seleccionar a los pacientes probables a CHIKF, con previa autorización del paciente tras leer y firmar el consentimiento informado, se les tomó una muestra de sangre de 5mL, distribuida en un tubo rojo Vacutainer® sin anticoagulante. Además, se aplicó el formato de estudio epidemiológico para la recolección de información como edad, sexo, lugares visitados en las últimas dos semanas y cuadro clínico básico: presencia de fiebre, poliartralgias, cefalea, mialgias, exantema, náuseas, dolor de espalda y vómito (Anexo 3) (Figura 14)



Figura 13. Localidades de estudio durante la vigilancia activa del virus CHIKV en el municipio de Suchiate, Chiapas. Viviendas muestreadas en Ciudad Hidalgo (foto izquierda). Centro centinela “Clínica Médica Guadalupe”, Ejido “La Libertad” (foto derecha) (fotos tomadas por el autor, 2014).



Figura 14. Firma de consentimiento informado, llenado de encuesta epidemiológica y toma de muestra sanguínea a pacientes probables a la fiebre chikungunya (foto tomada por el autor, 2014).

Diagnóstico serológico y molecular mediante las pruebas de ELISA y qRT-PCR

Primeramente, se realizó la separación del suero a través de una centrifugación fría a 3,000 rpm, y posteriormente se hicieron alícuotas de 200 μ L, todo esto en el Centro Regional de Investigación en Salud Pública. Posteriormente los sueros fueron enviados en dióxido de carbono sólido a -70°C al laboratorio de Patología de la Universidad de Texas.

Para la extracción del ARN, se utilizó el método de extracción con columna utilizando el estuche comercial ZR-96 Viral RNA (Zymo Research, Orange, CA). A partir del suero humano, se tomaron 140 μ L para proseguir la extracción tal cual detalla el protocolo del fabricante. A la par se realizaron extracciones de dos controles negativos (suero de un paciente negativo a CHIKV y agua libre de ARNasas) y dos controles positivos (cepa Y011213 RNA del Caribe) (Anexo 4).

El diagnóstico molecular de CHIKV se realizó bajo la técnica de RT-PCR Tiempo real, utilizando el estuche comercial TaqMan RNA-to-Ct 1-step Kit (Applied Biosystems, San Francisco, CA). Para cada reacción, se tomaron 40µL de la mezcla de reacción junto con 10µL del ARN proveniente de una muestra de suero. Cada muestra se realizó por duplicado y se incluyeron siempre dos controles negativos y dos positivos. El equipo utilizado para efectuar la reacción fue el termociclador tiempo real 900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, San Francisco, CA). El protocolo completo que incluye los iniciadores junto con la sonda marcada con el fluoróforo FAM, las condiciones de la reacción, el programa de ciclos para el termociclador tiempo real y los valores de interpretación se encuentran en el Anexo 5 (Powers & Roehrig, 2010).

Además, se efectuó la técnica de ELISA para detectar la presencia de anticuerpos IgM (Erasmus *et al.*, 2015). A partir de una alícuota de suero de un paciente, se tomaron 4 µL para hacer una dilución 1:100 completando a 400 µL en un pozo de la placa, cada una de las muestras por duplicado. Después se siguió el protocolo del fabricante, utilizando 3 repeticiones para el control positivo y 3 repeticiones para el control negativo (Anexo 6). El equipo utilizado para efectuar las el diagnóstico serológico fue el VERSAmax tunable microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Análisis estadístico

La comparación de las frecuencias de los diferentes síntomas y el diagnóstico (qRT-PCR y ELISA) entre las localidades de Ciudad Hidalgo y el ejido “La Libertad” fueron realizadas con tablas de contingencia de 2x2 con distribución de Chi-cuadrada. Además, se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para datos independientes para comparar las medianas de la edad y el lapso entre toma de muestra e inicio de síntomas entre ambas localidades, obteniéndose adicionalmente los intervalos de confianza al 95%. Para la comparación de los porcentajes de sexos positivos a CHIKV en ambas localidades, se utilizó la prueba de comparación de proporciones para dos muestras con distribución Z. Finalmente, para comparar la distribución de los casos por edad en ambas localidades, se categorizaron los datos en adultos menores de 45 años y en adultos de 45 años o más y se utilizó la prueba exacta de Fisher. Para todas las pruebas, se

consideró una significancia de 0.05 y todos estos análisis se efectuaron en el programa Minitab 17® (State College, PA).

RESULTADOS

El muestreo en las localidades de Ciudad Hidalgo y el ejido “La Libertad, pertenecientes al municipio de Suchiate, Chiapas, inició el día 9 de octubre y terminó hasta el 26 de noviembre del 2014. Durante este periodo, se atendieron un total de 86 pacientes, todos ellos cumplieron los criterios de inclusión: 1) caso probable de fiebre chikungunya presentando fiebre y/o poliartralgia y 2) firmaron el consentimiento informado. A cada uno de estos pacientes se les tomó una muestra de sangre y posteriormente en el laboratorio de arbovirología del Centro Regional de Investigación en Salud Pública se separó el suero de cada muestra.

Sin embargo, de las 86 muestras obtenidas, solo se consideraron 65 de ellas para el diagnóstico porque el resto tuvieron datos faltantes y/o porque fueron muestras lipémicas y/o hemolizadas. Las muestras fueron enviadas en dióxido de carbono sólido a -70°C al laboratorio de Patología de la Universidad de Texas para su procesamiento. A partir de estas muestras, se obtuvo que 59 (90.8%) fueron positivas mientras que las restantes seis fueron negativas (9.2%). De los pacientes positivos, 16 fueron diagnosticados por qRT-PCR (27.1%) y 43 por ELISA (72.9%). La distribución de casos positivos por localidad fue de 28 casos (47.5%) en Ciudad Hidalgo y 31 (52.5%) en el ejido “La Libertad”, no encontrándose diferencias significativas entre los porcentajes de positividad de ambas localidades (Tabla 1).

Con respecto al tema de migración, se observó que hubo una diferencia significativa entre el porcentaje de pacientes positivos a CHIKV que hicieron un movimiento migratorio, siendo Ciudad Hidalgo donde se presentó mayor migración ($p<0.05$) (Tabla 1). Aunque 16 (27.1%) pacientes de ambas localidades reportaron haber viajado en las últimas dos semanas, solamente cinco pacientes de Ciudad Hidalgo (8.5%) hicieron un viaje a Guatemala y el resto fue a diferentes localidades de la región, como Tapachula y Acapetahua.

Los síntomas observados en el brote fueron fiebre (92.3%), poliartralgias (81.4%), exantema (54.25), cefalea (61%), mialgias (54.2%), dolor de espalda (49.2%), náuseas (22.0%) y vómitos (15.3%). Los síntomas clínicamente más visibles en ambas localidades fue la poliartralgia edematosa y el exantema (Figura 15). Es importante mencionar que,

los porcentajes de los síntomas registrados variaron entre las dos localidades. Por ejemplo, la poliartralgia y el exantema fueron significativamente superiores en el ejido “La Libertad” con los porcentajes de 100% y 83.9% que con los de Ciudad Hidalgo que fueron de 60.7% y 21.4%, respectivamente (ambos con $p < 0.05$) (Tabla 1). Similarmente ocurrió lo mismo con la cefalea, mialgias y dolor de espalda, reportándose mayores frecuencias en el ejido “La Libertad” (87.1%, 80.6% y 77.4%, respectivamente), que las frecuencias observadas en Ciudad Hidalgo (32.1%, 25% y 17.9%, respectivamente), siendo significativamente diferentes en estos tres síntomas ($p < 0.01$) (Tabla 1).

En cuanto a los días que pasaron entre la toma de la muestra e inicio de los síntomas, no se observaron diferencias significativas entre las localidades de Ciudad Hidalgo y el ejido “La Libertad” ($p > 0.05$).

	Ciudad Hidalgo			La Libertad			Total		Valor <i>p</i>
Edad (Mediana, IC 95%)	30.5 (20.3-36.6)			32.0 (27.0-55.0)			31.0 (27.0-37.5)		0.1178
Días entre toma de muestra e inicio de síntomas (Mediana, IC 95%)	8.00 (4.34-9.55)			6.00 (2.68-8.33)			7.00 (4.00-8.46)		0.3646
Diagnóstico y síntomas	N	%	% del total	N	%	% del total	N	%	
CHIKV positivo	28	100	47.5	31	100	52.5	59	100	-
CHIKV positivo por qRT-PCR	7	25.0	11.9	9	29.0	15.3	16	27.1	0.728
CHIKV positivo por IgM ELISA	21	75.0	35.6	22	71.0	37.3	43	72.9	0.728
Migración	12	42.9	20.3	4	12.9	6.80	16	27.1	0.0176*
Fiebre	26	92.3	47.5	29	93.5	52.5	55	93.2	0.916
Poliartralgia	17	60.7	28.8	31	100	52.5	48	81.4	<0.001*
Cefalea	9	32.1	15.3	27	87.1	45.8	36	61	<0.001*
Mialgias	7	25.0	11.9	25	80.6	42.4	32	54.2	<0.001*
Dolor de espalda	5	17.9	8.5	24	77.4	40.7	29	49.2	<0.001*
Náuseas	4	14.3	6.8	9	29.0	15.3	13	22.0	0.167
Vómitos	2	7.1	3.4	7	22.6	11.9	9	15.3	-
Exantema	6	21.4	10.2	26	83.9	44.1	32	54.2	<0.001*

Tabla 1. Datos epidemiológicos básicos del brote de CHIKV en las localidades de Ciudad Hidalgo y el ejido “La Libertad”, municipio de Suchiate, Chiapas, Octubre-Noviembre 2014. *Estadísticamente significativo con $p < 0.05$



Figura 15. Síntomas clínicamente más visibles: poliartralgia edematosa (fotos superiores) y exantema (fotos inferiores). (Fotos tomadas por el autor, 2014).

Con respecto a la distribución de los casos por edad, se observó que los casos se distribuyeron en todos los grupos de edad, aunque no de manera equitativa. En Ciudad Hidalgo, se observó que las mayores frecuencias de casos fueron en menores de 20 años y adultos de entre 31-40 años. En cambio, en el ejido “La Libertad”, la mayoría de los casos se concentró en adultos de 21-30 años y en adultos de más de 50 años. Después de hacer la categorización en casos menores de 45 años y en casos de 45 años o más, se encontraron diferencias significativas entre ambas localidades habiendo más casos de 45 años o más en el ejido “La Libertad” ($p=0.023$) (Figura 16).

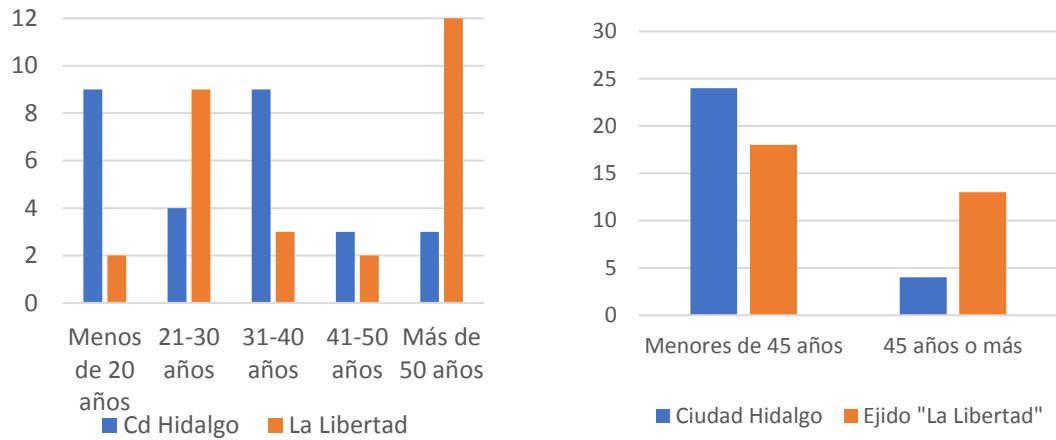


Figura 16. Gráficas de distribución por edades de casos positivos de CHIKV, Suchiate Chiapas, octubre-noviembre 2014.

En ambas localidades se observó que la distribución de los casos por sexo fue mayor en las mujeres que en los hombres, teniendo en el ejido “La Libertad” 18 casos (58%) y en Ciudad Hidalgo 20 casos (71%) del sexo femenino. En cambio, la frecuencia en los hombres fue de 13 casos (42%) y 8 casos (29%), respectivamente. Sin embargo, solamente en Ciudad Hidalgo se encontraron diferencias significativas ($p < 0.01$) mientras que en el ejido “La Libertad” no fue el caso ($p = 0.198$) (Figura 17).

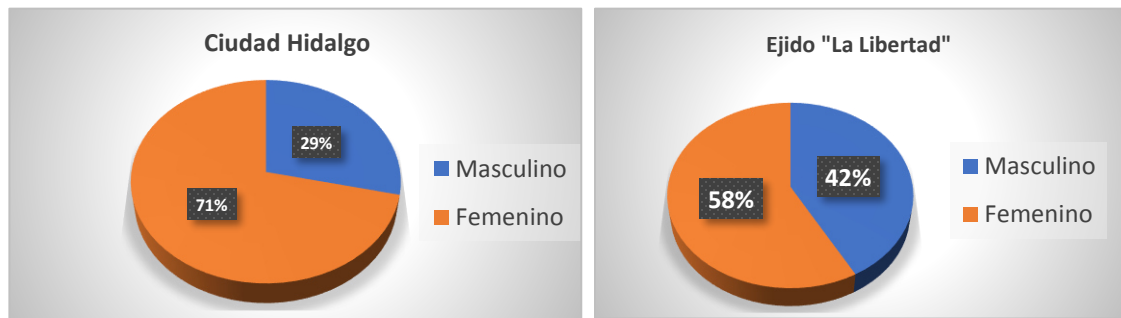


Figura 17. Distribución por sexo de los casos confirmados de CHIKV en las comunidades de Ciudad Hidalgo y el ejido “La Libertad”, Suchiate, Chiapas, octubre-noviembre del 2014.

DISCUSIÓN

El virus chikungunya es una de las enfermedades arbovirales que más rápido se ha diseminado en el nuevo milenio. En cuestión de los últimos 10 años, el virus se diseminó desde el continente africano y asiático hacia las islas del Pacífico y el continente americano. Después de la llegada de CHIKV al Nuevo Mundo, inició su dispersión desde el Caribe hacia Centroamérica y Sudamérica durante el 2014. Finalmente, el virus llegó a la frontera sur de México con Guatemala, en las comunidades de Ciudad Hidalgo y el ejido “La Libertad”, en el municipio de Suchiate, Chiapas, en el mes de octubre del 2014. El primer caso oficial reportado por el CENAPRECE fue realizado hasta el mes de noviembre del mismo año en el municipio de Arriaga, Chiapas, localizado al norte del Estado de Chiapas (CENAPRECE, 2014).

Históricamente, la porosa frontera de México-Guatemala, ha registrado un constante movimiento migratorio por cuestiones comerciales, como una ruta de paso hacia los Estados Unidos y/o por conflictos bélicos del pasado (Ogren, 2007). Este flujo constante de personas entre México y Guatemala ha sido probablemente un factor determinante ante el ingreso de CHIKV a nuestro país. En nuestro estudio, cinco (8.5%) de los 59 casos positivos, todos provenientes de Ciudad Hidalgo, reportaron haber visitado Guatemala en las últimas dos semanas, lo cual sugiere que pudieron haber adquirido el virus en ese país. Es importante mencionar que el ingreso de enfermedades arbovirales a nuestro país no ha sido nada nuevo, porque en el año de 1978, el virus del dengue reemergió utilizando la misma puerta de entrada: la Frontera Sur del estado de Chiapas (Narro Robles & Gómez Dantés, 1995). Este antecedente, más el ingreso de CHIKV en el 2014, deja vulnerable esta región ante la emergencia de otras arbovirosis, tal como sucedió con el virus Zika en noviembre del año 2015 (Guerbois *et al.*, 2016), o ante la posible emergencia del virus Mayaro, que actualmente está circulando en Sudamérica y Centroamérica (García-Rejón, 2016).

Los principales síntomas observados en el brote de Suchiate, Chiapas fueron los que comúnmente se han reportado en la mayoría de los brotes alrededor del mundo (Anexo 11), siendo la fiebre, la poliartralgia y el exantema los más comunes. Sin embargo, las frecuencias de los síntomas varió entre las localidades del ejido “La Libertad” y Ciudad

Hidalgo, siendo significativamente mayores los porcentajes de poliartralgia (100%), exantema (83.9%), cefalea (87.1%), mialgias (80.6%) y dolor de espalda (77.4%) en la primera que en la segunda (60.7%, 21.4%, 32.1%, 25.0% y 17.9%, respectivamente). A pesar de que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el diagnóstico por qRT-PCR y ELISA, edad y días entre toma de muestra e inicio de síntomas, es posible que la razón que explique las diferencias en los síntomas entre ambas localidades esté en la distribución de las edades. En el ejido “La Libertad”, se presentaron más pacientes positivos a CHIKV de 45 años o más que los que se presentaron en Ciudad Hidalgo ($p < 0.05$). Ha sido reportado que pacientes de mayor edad tienen mayor riesgo de tener un cuadro clínico más severo, tener secuelas más prolongadas e incluso fallecer (Borgherini *et al.*, 2007, 2008; Paquet *et al.*, 2006). Otra posible explicación a tales diferencias pudiera recaer en el método de muestreo. En el caso de Ciudad Hidalgo, no existió ninguna discriminación al seleccionar a los pacientes salvo los hombres que en el momento del muestreo no se encontraron en el hogar. En cambio, en el ejido “La Libertad”, los pacientes que fueron a la toma de muestras sanguíneas son aquellos que regularmente visitan las reuniones ejidales o son familiares de éstos y que se enteraron del muestreo. Generalmente las personas de la tercera edad son las personas que acuden con regularidad a las reuniones ejidales (Velázquez, 2010) y esto puede explicar la mayor cantidad de adultos mayores presentes en el estudio en el ejido “La Libertad”.

En este objetivo se pueden mencionar algunas limitaciones. La falta de representatividad y un tamaño adecuado de la muestra hace que no se puedan hacer inferencias a nivel poblacional. Además, se presentaron algunas dificultades para tener muestras apropiadas, debido a que algunas de ellas se hemolizaron y otras resultaron estar lipémicas. Sin embargo, la finalidad de este objetivo era detectar la entrada del virus a nuestro país y hacer un estudio preliminar sobre el patrón epidemiológico de esta nueva enfermedad arboviral. Este estudio sirvió de base para la proposición del tercer objetivo de este trabajo.

CAPÍTULO 2: Incriminar al mosquito *Aedes aegypti* como vector de CHIKV en el estado de Chiapas, México

RESUMEN

Durante el brote de la fiebre chikungunya a finales del 2014 en el municipio de Suchiate, Chiapas, se llevó a cabo una vigilancia entomológica para incriminar a los potenciales vectores de este arbovirus. En este municipio se seleccionó la localidad de Ciudad Hidalgo para realizar las colectas de mosquitos, específicamente en las colonias de San Juan, San Caralampio, 15 de Enero y 26 de Julio. En estos sitios, se colectaron 75 domicilios con casos sospechosos de CHIKF, de los cuales 60 (80%) tuvieron *Aedes aegypti* y 2 (2.7%) *Aedes albopictus*. Un total de 1,170 mosquitos *Ae. aegypti* y cinco *Ae. albopictus* fueron colectados, siendo del primer vector 635 hembras y del segundo tres. Un total de 81 lotes se generaron, siendo 79 lotes de hembras *Ae. aegypti* y dos lotes de hembras *Ae. albopictus*. Aunque ninguno de los dos lotes de *Ae. albopictus* fue positivo, 18 lotes (22.8%) de *Ae. aegypti* fueron positivos a CHIKV teniendo una tasa de infección de 32.3/1000 mosquitos. La falta de inmunidad de rebaño en conjunto con las altas poblaciones vectoriales, el control de vectores deficiente en esta localidad y muestreos dirigidos en localidades con brotes explican las altas tasas de infección en este vector. Consistente con las predicciones de estudios de competencia vectorial previos, el mosquito *Ae. aegypti* es el principal vector de CHIKV en el sur de México, mientras que el rol de *Ae. albopictus* permanece desconocido.

INTRODUCCIÓN

Desde que fue descubierto el virus chikungunya en Tanzania en el año de 1952, se han hecho esfuerzos para incriminar cuáles son los vectores involucrados en la transmisión de este arbovirus. La mayoría de los vectores que se han asociado a la transmisión de CHIKV pertenecen al género *Aedes*. Los ciclos de transmisión de los virus son muy distintos en los entornos rurales y urbanos, reflejando en cada uno la diversa fauna de mosquitos en cada uno de estos entornos ecológicos (Sang *et al.*, 2008).

En África, CHIKV es ampliamente mantenido en ciclos enzooticos involucrando primates salvajes y mosquitos *Aedes* selváticos. Una cantidad de especies vectores selváticas han sido implicadas durante el periodo de 1952-2004 en la transmisión selvática de CHIKV: *Ae. africanus* en África del Este (McCrae *et al.*, 1971); *Ae. furcifer*, *Ae. taylori*, *Ae. dalzieli* y *Ae. luteocephalus* en África occidental (Diallo *et al.*, 1999; Jupp & McIntosh, 1990), y *Ae. cordellieri* en Sudáfrica (Jupp & McIntosh, 1990).

La primera sospecha sobre el rol de *Ae. aegypti* en la transmisión rural de CHIKV fue elucidada en el primer brote descrito en Newala, Tanzania durante 1952, cuando se encontró en esta localidad una alta densidad de este vector, además que la cepa aislada de esta especie de mosquitos colectados durante la epidemia ocasionó la muerte en dos de 11 ratones lactantes. Adicionalmente, los aislados de los ratones lactantes muertos fueron neutralizados con sueros de conejos inmunes a una cepa de chikungunya (Ross, 1956). Luego, en la epidemia de 1963-1964 en la India, el vector *Ae. aegypti* fue encontrado infectado naturalmente y estuvo involucrado en la transmisión urbana de CHIKV (Myers *et al.*, 1965; Sarkar, 1966).

Cuando reemergió CHIKV en el año 2004 en África, en un inicio el vector incriminado en los brotes de Comoros y Kenya en el año del 2005 fue *Ae. aegypti* (Sang *et al.*, 2008). Sin embargo, cuando el virus durante la epidemia del 2005-2006 invade la isla de La Reunión en el Océano Índico, surge *Ae. albopictus* como un nuevo vector de CHIKV (Delatte *et al.*, 2008; Reiter *et al.*, 2006). Durante la epidemia de Gabón en 2007 en África Central, *Ae. albopictus* sirve también como el principal vector de CHIKV (Leroy *et al.*, 2009; Paupy *et al.*, 2010). Luego que el virus se dispersara hacia el continente asiático, ocasionando brotes en la India en el año 2006 y en Tailandia en 2009, siendo en

este último país donde CHIKV fuera transmitido principalmente por *Ae. albopictus* y de manera secundaria por *Ae. aegypti* (Thavara *et al.*, 2009). La razón por la cual *Ae. albopictus* se convirtiera en un nuevo vector durante estas epidemias se debió a la aparición de la mutación E1-A226V en el linaje ECSA de CHIKV, que favorece la transmisión preferentemente en este vector (Tsetsarkin *et al.*, 2007; Vazeille *et al.*, 2007).

Sin embargo, surgió un brote de manera independiente causado por el linaje asiático de CHIKV en las islas del Pacífico Sur en el año 2011, en donde se asumió que el principal vector fue *Ae. aegypti* en Nueva Caledonia en base a estudios de competencia vectorial y que, además, *Ae. albopictus* está ausente en este país (Dupont-Rouzeyrol *et al.*, 2012). Adicionalmente, durante la epidemia del 2013 en la isla de Yap, en los Estados Federados de Micronesia, se incriminó a otro vector en la transmisión de CHIKV: *Aedes hensilli* (Savage *et al.*, 2015).

Después que CHIKV ingresó al continente americano en la isla de San Martín en el año 2013, y se fuera propagando a través de Centroamérica y Sudamérica durante el año 2014, no se había reportado el rol que tuvieran los vectores *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* en los brotes del Nuevo Mundo. A pesar de que existen estudios que comprueban que las poblaciones americanas de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* son competentes a la infección por CHIKV (Vega-Rúa *et al.*, 2014), no existe un estudio que busque las infecciones naturales en estos vectores. Este es el primer estudio en el continente americano que tiene como objetivo incriminar al mosquito *Ae. aegypti* como vector de CHIKV en la comunidad de Ciudad Hidalgo, Suchiate, Chiapas, donde estuvo ocurriendo un brote durante los meses de septiembre a noviembre del año 2014.

MATERIAL Y MÉTODOS

Área de estudio

La colección de mosquitos se realizó en el municipio fronterizo de Suchiate, Chiapas. Se ubica en la Llanura Costera del Pacífico, predominando el relieve plano. Sus coordenadas geográficas son 14° 41"N y 92° 09"O. Limita al norte con el municipio de la Frontera Hidalgo, al sur con el océano Pacífico, al oriente con la República de Guatemala y al poniente con el municipio de Tapachula. Su extensión territorial es de 236.79 km² que representa el 0.80% de la superficie del estado y su altitud es de 20 msnm. El clima es cálido subhúmedo con lluvias en verano y su vegetación es selva baja (INAFED, 2010). El municipio de Suchiate tiene un rezago social medio y con un 81.2% de su población en situación de pobreza. Además, el 13.5% y el 15.3% de la población carece de agua entubada y sistema de drenaje, respectivamente (CONEVAL, 2015, 2017). En este municipio, se seleccionaron varias colonias de la localidad de Ciudad Hidalgo para realizar los muestreos de mosquitos: San Caralampio, San Juan, 15 de enero y 26 de Julio (Figura 18).

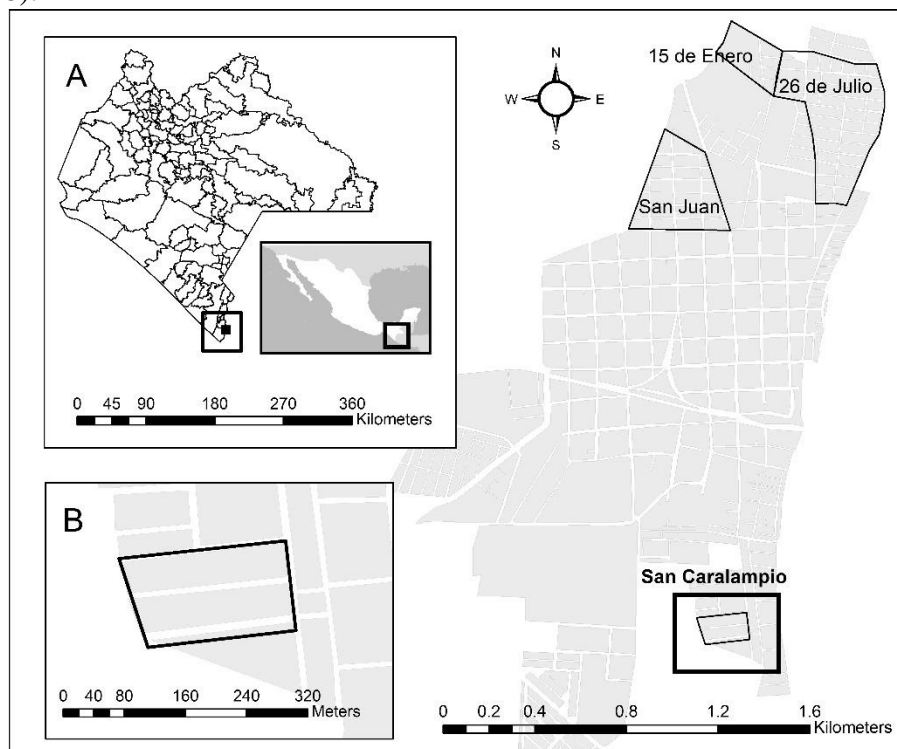


Figura 18. Área de estudio del muestreo de mosquitos adultos en la localidad de Ciudad Hidalgo. A) Estado de Chiapas, municipio de Suchiate. B) Colonia San Caralampio, donde se colectaron 44 de las 75 viviendas incluidas en el estudio.

Colecta e identificación de mosquitos

Las colectas de mosquitos se realizaron con el aspirador motorizado de espalda CDC (Clark *et al.*, 1994). El personal solicitó el permiso a la vivienda para ingresar y después efectuar el aspirado en 10-15 minutos (Figura 19). Los contendores con los especímenes vivos fueron transportados al Laboratorio de Arbovirología en hieleras con un gel congelado a -4°C cubierto de periódico, para proveerles una temperatura y humedad adecuada. En laboratorio, los contendores con mosquitos se guardaron a -20°C durante 20 minutos para inmovilizarlos y poderlos separar en la plancha fría Chilltable® (Bioquip, Rancho Dominguez, CA) a una temperatura entre -5°C a -10°C y finalmente proseguir con la identificación taxonómica de los mosquitos. Los mosquitos fueron agrupados en lotes por vivienda, especie y sexo en microtubos eppendorf® de 2mL y serán almacenados a -75°C . Después de formar los lotes de mosquitos, se enviaron en dióxido de carbono sólido a -70°C al laboratorio de patología de la Universidad de Texas para el diagnóstico.



Figura 19. Colección de mosquitos en los domicilios de las colonias de Ciudad Hidalgo, Suchiate, Chiapas, octubre-diciembre, 2014 (Foto tomada por el autor, 2014)

Diagnóstico molecular mediante la técnica de qRT-PCR

En el caso de muestras sólidas como mosquitos, previamente se homogenizarán en tubos Eppendorf de 0.2 ml con medio L-15 (Invitrogen, Carlsberg, CA) (complementado con suero bovino fetal al 2% [Hyclone, Logan, UT], penicilina [100 U/ml], estreptomicina [100 mg/ml] y anfotericina B [0.25 μg /ml]) durante 30 segundos usando un macerador eléctrico inalámbrico con pistilo (Daigger, Vernon Hills, IL). Posteriormente se centrifugarán en una microcentrífuga durante 5 minutos para obtener un sobrenadante.

Para la extracción del ARN, se utilizó el método de extracción con columna utilizando el estuche comercial ZR-96 Viral RNA Kit (Zymo Research, Orange, CA). A

partir del sobrenadante, se tomaron 140 μ L para proseguir la extracción tal cual detalla el protocolo del fabricante. Para especímenes de mosquitos se añadirá un lavado adicional con el amortiguador AW1. A la par se realizaron extracciones de dos controles negativos (suero de un paciente negativo a CHIKV y agua libre de ARNasas) y dos controles positivos (cepa Y011213 RNA del Caribe) (Anexo 4).

El diagnóstico molecular de CHIKV se realizó bajo la técnica de RT-PCR Tiempo real, utilizando el estuche comercial TaqMan RNA-to-Ct 1-step Kit (Applied Biosystems, San Francisco, CA). Para cada reacción, se tomaron 40 μ L de la mezcla de reacción junto con 10 μ L del ARN proveniente de una muestra de suero. Cada muestra se realizó por duplicado y se incluyeron siempre dos controles negativos y dos positivos. El equipo utilizado para efectuar la reacción fue el termociclador tiempo real 900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, San Francisco, CA). El protocolo completo que incluye los iniciadores junto con la sonda marcada con el fluoróforo FAM, las condiciones de la reacción, el programa de ciclos para el termociclador tiempo real y los valores de interpretación se encuentran en el Anexo 5.

Cultivo celular para medir efecto citopático

El ensayo de efecto citopático (CPE) fue utilizado para detectar partículas virales infecciosas de los mosquitos positivos a qRT-PCR. Las células Vero confluentes fueron inoculadas con 100 μ L del sobrenadante de cada lote de mosquitos homogenizado. Las placas con las células Vero inoculadas se incubaron durante 4 días a 37°C con 5% de CO₂ en medio esencial mínimo modificado de Dulbecco (Gibco, Grand Island, NY) suplementado con gentamicina y 2% de suero bovino fetal. Después de completado el periodo de incubación, las células fueron fijadas con formaldehído al 10% y teñidas con cristal violeta para visualizar el efecto citopático. La cepa vacunal de CHIKV 181/25 fue utilizada como control positivo y dos lotes de mosquitos negativos a CHIKV fueron usados como controles negativos (Anexo 7).

Secuenciación del fragmento E1/E2 y análisis filogenético

El ARN viral extraído de cada lote de mosquitos fue utilizado para generar el ADN complementario usando el estuche comercial SuperScript® III First- Strand Synthesis Kit (Invitrogen, Waltham, MA), de acuerdo con el protocolo del fabricante. El estuche

comercial Phusion® High-Fidelity PCR Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA) fue utilizado luego para generar los tres amplicones sobrepuestos de la región E1/E2, las cuales luego fueron purificadas utilizando el estuche BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA) y después secuenciados utilizando el equipo ABI Prism model 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems) (Anexo 8). El programa Sequencher v5.0.1 (Gene Codes, Ann Arbor, MI) fue utilizado para editar y ensamblar las secuencias. La búsqueda de la mutación adaptativa para la transmisión de CHIKV en *Ae. albopictus* (E1-A226V) (Tsetsarkin *et al.*, 2007) fue realizada en la base de datos de dominios conservados (CDD) del NCBI para cada secuencia obtenida.

Las secuencias parciales de E1/E2 fueron comparadas con 28 secuencias que contenían el marco de lectura abierto de todo el genoma de CHIKV de diversos brotes alrededor del mundo, de las cuales se incluyeron las secuencias de México: CH0008, CH0045, CH0072, TA0031 y LI0006 (Acceso Genbank: KT327163, KT327164, KT327165, KT327166, and KT3271678). Las primeras dos secuencias mexicanas fueron obtenidas de dos casos de las colonias San Juan y San Caralampio, respectivamente, en las primeras dos semanas de octubre del 2014. Los alineamientos fueron realizados con el algoritmo MUSCLE (Drive, Mill Valley, CA). Un árbol de máxima verosimilitud fue reconstruido utilizando el programa MEGA 7.0 (Pennsylvania State University, PA), ajustado al mejor modelo de sustitución estimado por el programa MODELTEST v3.7 (Brigham Young University, Provo, UT) y con un remuestreo “Bootstrap” de 500 réplicas.

Análisis estadístico

La tasa de infección a CHIKV de mosquitos fue calculada utilizando el método de estimación de máxima verosimilitud (Maximum likelihood estimation, MLE) para tamaños de lote desigual. El programa utilizado fue el LoteedInfRate 4.0 (CDC, Fort Collins, CO), que es una macro para ejecutarse en Microsoft Excel. Este programa estimó el MLE con un intervalo de confianza al 95% bajo métodos de corrección de MLE. Únicamente para datos de la colonia de San Caralampio, se utilizó el test de Mann-Whitney con el programa Statgraphics 16.1.11 (StatPoint Technologies Inc., Warrenton, VA) para comparar las medianas de mosquitos entre viviendas positivas a infección con al menos un mosquito y viviendas negativas.

RESULTADOS

Durante el brote de CHIKV ocurrido durante los meses de septiembre-noviembre del año 2014 en el municipio de Suchiate, se colectaron en un total de 2,380 mosquitos en un total de 147 casas de la localidad de Ciudad Hidalgo, Chiapas. Las especies predominantes fueron 1550 *Ae. aegypti* y 674 *Culex quinquefasciatus*, mientras que otras especies con pocos individuos fueron colectadas: 5 *Ae. albopictus* y 4 *Culex coronator*. Adicionalmente, se colectaron más mosquitos pero que solo pudieron ser identificados hasta género: 117 *Culex spp.*, 29 *Mansonia spp.* y 1 *Haemagogus spp.* (Tabla 2).

Con referente a las densidades de *Ae. aegypti*, del total colectado se encontraron 820 hembras (52.9%) y 730 machos (47.1%). Además, se observó una alta infestación de este vector colectándose en 112 de los 147 domicilios (72.0%). El promedio que se observó de mosquitos hembra dentro de los domicilios fue de 5.60 hembras por casa. En cambio, las densidades de mosquitos *Ae. albopictus* fueron muy bajas, encontrándose solamente 5 individuos, de los cuales 3 fueron hembras y 2 machos, colectados a partir de 3 domicilios (1.7%) (Tabla 2).

Especies	Hembras	Machos	Total	Lotes hembras	Hembras / Lote	Hembras / casa	Casas positivas (%)
<i>Aedes aegypti</i>	820	730	1550	132	6.2	5.60	112 (76.2%)
<i>Aedes albopictus</i>	3	2	5	3	1.0	0.02	3 (2.0%)
<i>Culex quinquefasciatus</i>	366	308	674	97	3.77	2.50	90 (61.2%)
<i>Culex coronator</i>	4	0	4	3	1.33	0.02	3 (2.0%)
<i>Culex spp.</i>	117	0	117	6	9.47	0.80	-
<i>Mansonia spp.</i>	29	0	29	20	1.45	0.20	-
<i>Haemagogus spp.</i>	0	1	1	-	-	-	-
Total	1339	1041	2380	261	-	-	-

Tabla 2. Colección de Mosquitos en 147 viviendas de Ciudad Hidalgo, Suchiate, Chiapas

Sin embargo, por cuestiones de recursos limitados para procesar los mosquitos, se realizó una selección a conveniencia de 635 hembras *Ae. aegypti* provenientes de 75 domicilios de Ciudad Hidalgo, Suchiate. De las 635 hembras colectadas en Ciudad Hidalgo, 79 lotes de *Ae. aegypti* y dos de *Ae. albopictus* fueron analizados por qRT-PCR para detectar el ARN de CHIKV. Dieciocho lotes de *Ae. aegypti* (22.8%) fueron positivos, mientras que ambos lotes de *Ae. albopictus* fueron negativos. Los ensayos de CPE fueron utilizados para confirmar la presencia de partículas virales infecciosas, las cuales estuvieron presentes en 12 de los 18 lotes positivos a CHIKV. Las muestras negativas a CPE pudieron haber tenido bajos títulos virales que después se habrían reducido por dos ciclos de congelación-descongelación de las muestras: una para homogenizar los lotes y la otra para aislar el ARN. Una de las casas de la colonia San Juan tuvo tres de los 18 lotes positivos, por lo tanto, 16 (21.3%) de las 75 casas tuvieron presencia de mosquitos infectados a CHIKV (Tabla 3). Utilizando estos datos, se determinó que la tasa mínima de infección en mosquitos de campo en las colonias de Ciudad Hidalgo fue de 32.26/1,000 mosquitos (IC 95% = 20.06–49.62). Además, no se encontraron diferencias significativas en la densidad de mosquitos por casa entre casas con mosquitos infectados a CHIKV y negativos ($p>0.05$).

Cinco lotes positivos fueron seleccionados para la secuenciación parcial de las regiones E1/E2: dos de la colonia San Caralampio, H111-0024 y H111-0026 (Números de acceso al Genbank: KT444685 y KT444686, respectivamente) y tres de la colonia San Juan, H111-0033, H111-0043 y H111-0044 (Números de acceso al Genbank: KT444687, KT444688, y KT444689, respectivamente). En la elaboración del árbol filogenético de máxima verosimilitud, el modelo de sustitución que mejor se ajustó fue el de Tamura Nei. Al observar los diferentes clados, se observó que las secuencias de CHIKV obtenidas de mosquitos infectados están altamente relacionadas con las secuencias de CHIKV aisladas de los humanos durante el brote en Ciudad Hidalgo. Estas secuencias pertenecieron al linaje asiático y estuvieron bastante relacionadas con secuencias del Caribe (Islas Vírgenes Británicas) y de Centroamérica (Guatemala) (Figura 20). En ninguna de las secuencias obtenidas se encontró la mutación adaptativa E1-A226V.

Tabla 3. Resumen de colectas de mosquitos hembra *Ae. aegypti* en la localidad de Ciudad Hidalgo, Suchiate, Chiapas, octubre-diciembre, 2014.

Colonia	Total de casas	Total de hembras <i>Ae. aegypti</i>	Media de hembras <i>Ae. aegypti</i> por casa	% Casas con presencia de <i>Ae. aegypti</i> (n)	% Casas con mosquitos <i>Ae. aegypti</i> positivos a CHIKV (n)	Mediana de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> por casa positivos a CHIKV (CI 95%)	% Casas con mosquitos <i>Ae. aegypti</i> negativos a CHIKV (n)	Mediana de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> por casa negativos a CHIKV (CI 95%)
San Caralampio	44	302	6.9	81.8 (36)	25.0 (11)	8.0 (4.9-21.3)	56.8 (25)	4.0 (1.2-8.2)
San Juan	13	140	10.8	76.9 (10)	38.5 (5)	13.0 (3.0-40.0)	61.5 (8)	8.0 (1.0-14.3)
15 de Enero	10	155	15.5	80.0 (8)	0.0 (0)	0.0	80.0 (8)	11.5 (8.5-24.9)
26 de Julio	8	38	4.8	75.0 (6)	0.0 (0)	0.0	75.0 (6)	3.5 (1.4-16.3)
Total	75	635	8.5	80.0 (60)	21.3 (16)	8.0 (5.0-13.0)	62.7 (47)	5.0 (3.4-10.0)

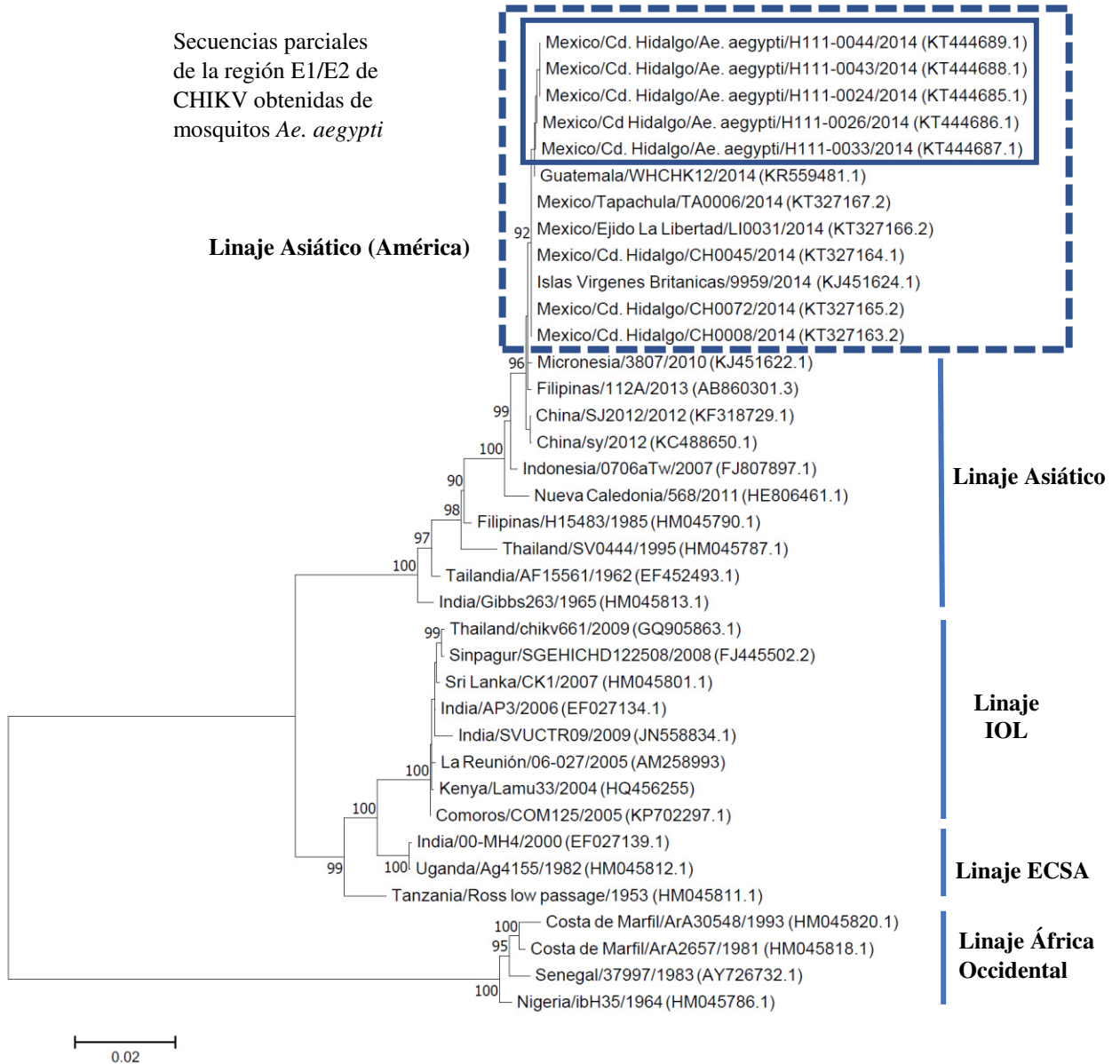


Figura 20. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en las secuencias parciales de la región E1/E2 de CHIKV aisladas de mosquitos infectados de Ciudad Hidalgo, Suchiate, Chiapas, octubre 2014.

DISCUSIÓN

La incriminación de los vectores de CHIKV en cada brote regional juega un rol muy importante en las medidas de control de vectores. Aunque *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* pueden coexistir en ambientes urbanos y usar contenedores artificiales como hábitats larvarios, *Ae. albopictus* es más abundante en entornos rurales y semiurbanos, y sus larvas están más localizadas en entornos naturales (Braks *et al.*, 2003). El conocimiento de los vectores involucrados en la transmisión de CHIKV permitirá focalizar los métodos de prevención y control sobre entornos urbanos, semiurbanos y/o rurales y tener como blanco los sitios de ovoposición. Los datos obtenidos en este trabajo indican que *Ae. aegypti* fue el principal vector epidémico del CHIKV en Ciudad Hidalgo, Chiapas basado en lo siguiente: 1) la detección por qRT-PCR y el asilamiento viral de CHIKV en mosquitos indicaron una alta tasa de vectores infectados temporalmente y asociados espacialmente a cinco casos de CHIKV en Ciudad Hidalgo, Suchiate y 2) Las secuencias E1/E2 de los virus aislados de mosquitos y humanos de Ciudad Hidalgo fueron prácticamente idénticas (Figura 19).

La alta tasa de infección de 32.26/1,000 mosquitos reportada durante el brote de Ciudad Hidalgo, Chiapas, es muy similar a lo reportado en el brote de Comoros en 2005 de 30.8/1,000 mosquitos *Ae. aegypti* aspirados a partir de los domicilios (Sang *et al.*, 2008). Además, se han reportado valores similares en mosquitos capturados durante brotes de otros arbovirus como el DENV. Por ejemplo, en un brote de DENV en el año 2007-2008 en Mérida, Yucatán, se observó una tasa de infección de 24-40/1,000 mosquitos (Garcia-Rejon *et al.*, 2008) y otro brote en el año 2005-2006 en Recife, Brasil, reportaron una tasa de infección de 29.9/1,000 mosquitos (Guedes *et al.*, 2010). Es importante remarcar que estos valores han sido encontrados durante periodos epidémicos, y en el caso de CHIKV, aún se desconocen los valores de tasa de infección de vectores durante periodos interepidémicos.

Las densidades mosquitos adultos es una de las variables que se ha logrado asociar con la incidencia de casos de arbovirus transmitidos por *Ae. aegypti*, como el DENV (Barrera *et al.*, 2002; Rodriguez-Figueroa *et al.*, 1995). Sin embargo, en este estudio no se pudo encontrar una diferencia significativa entre las medianas de mosquitos hembra por casa con al menos un mosquito positivo y de mosquitos negativos debido posiblemente a: 1) bajo número de colectas y/o 2) la población de Ciudad Hidalgo era susceptible a CHIKV y, por

lo tanto, incluso bajas densidades vectoriales pudieron haber transmitido el virus eficientemente, tal como ocurrió en un brote de DENV en Río de Janeiro, Brasil, en los años 2007-2008 (Honório *et al.*, 2009).

Aunque se colectaron muy pocos mosquitos *Ae. albopictus* (n=5), esta especie no puede ser descartada como un potencial vector en otras partes del estado de Chiapas y México. Para investigar esta posibilidad, se requieren una mayor cantidad de colectas, sobre todo en áreas templadas de nuestro país donde se distribuye este vector (Pech-May *et al.*, 2016). Sin embargo, se ha visto que el linaje asiático es transmitido eficientemente solo por *Ae. aegypti* y tiene una incapacidad de adaptarse a *Ae. albopictus* (Tsetsarkin *et al.*, 2011), aunado con la ausencia de la mutación adaptativa E1-226V de CHIKV (Tsetsarkin *et al.*, 2007) en nuestras secuencias, sugiere que el mosquito *Ae. aegypti* fue el principal vector en las localidades que se muestrearon.

La alta presencia de mosquitos hembras en 60 (80.0%) de las 75 casas muestreadas en las colonias de Ciudad Hidalgo, Chiapas, puede explicarse ante la constante falla de los métodos químicos de control de vectores que tradicionalmente se han utilizado para el control del dengue, los cuales se incluye principalmente el uso de piretroides y organofosforados (Horstick *et al.*, 2010). Además, la falta de agua entubada en un 13.5% de las viviendas y la necesidad de almacenar agua en tanques de cemento debido a que el servicio de agua potable está disponible cada dos-tres días, crean el perfecto nicho para la proliferación del vector en estas localidades (Arredondo-Jiménez & Valdez-Delgado, 2006; CONEVAL, 2017).

La innovación en nuevos métodos de control de vectores es necesaria para reducir la transmisión de arbovirus transmitidos por *Ae. aegypti*, por ejemplo, el uso de la técnica del insecto estéril, el cual incluye diversas estrategias: mosquitos transgénicos, irradiados e infectados por la bacteria *Wolbachia*, todos estos con la finalidad de reducir las poblaciones de campo (Lees *et al.*, 2015; Phuc *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2008). Además, el uso de *Wolbachia* puede bloquear la transmisión de los virus tanto del DENV como de CHIKV en *Ae. aegypti* (Moreira *et al.*, 2009).

CAPÍTULO 3: Describir los síntomas clínicos y análisis de laboratorio de pacientes agudos y convalecientes del hospital “Dr. Roberto Nettel”, Tapachula, Chiapas, México.

RESUMEN

El emergente virus chikungunya es un arbovirus que está causando brotes intensos en el continente americano. Las características clínicas de los brotes en México no han sido bien descritas y por lo tanto, se realizó un estudio de corte de un brote en el estado de Chiapas, Sur de México. A partir de pacientes sospechosos de tener la fiebre chikungunya del hospital “Dr. Roberto Nettel”, localizado en el municipio de Tapachula, se tomaron muestras de sangre. Además de la examinación clínica, se confirmó el diagnóstico con las técnicas de qRT-PCR (estandarizado para el linaje asiático) y la prueba de ELISA IgM anti-CHIKV y se realizaron análisis de laboratorio para medir los diferentes parámetros hematológicos y bioquímicos durante la infección a CHIKV. Del total de 850 pacientes que se presentaron como casos probables de CHIKF, se enrolaron 112 de ellos durante el periodo de noviembre 2014 – junio 2015. De estos, 95 (84.8%) fueron confirmados, siendo 62 (65.3%) positivos mediante la prueba de qRT-PCR y 33 (34.7%) seropositivo a IgM. Los restantes 17 (15.2%) fueron negativos a ambas pruebas. Los síntomas más frecuentes reportados en este brote fueron fiebre (100%), poliartralgia severa (72.1%) y exantema (82.3%). Anormalidades biológicas observadas durante la infección a CHIKV fueron linfopenia (41.1%), leucopenia (51.6%), altos niveles de transaminasas (30.5%-46.3%), altos niveles de LDH (46.3%) y altos niveles de PCR (61.3%). Los datos clínicos y biológicos obtenidos en este estudio están proveyendo más información útil para comprarlos con otros brotes alrededor del mundo y puede ser de ayuda para un mejor cuidado y tratamiento del paciente.

INTRODUCCIÓN

El virus chikungunya (CHIKV) es una enfermedad artrálgica que ha estado atacando al Nuevo Mundo desde el año 2013. La fiebre chikungunya (CHIKF) es causada por CHIKV que pertenece a la familia *Togaviridae*, género *Alphavirus*, y es transmitido por los mosquitos *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (Weaver & Lecuit, 2015).

Las manifestaciones clínicas de CHIKF han sido descritas en previos estudios y reportes de los brotes de África (Borgherini *et al.*, 2007; Nkoghe *et al.*, 2012; Sissoko *et al.*, 2010; Thiberville, Boisson, *et al.*, 2013), Europa (Rezza *et al.*, 2007) y Asia (Lakshmi *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2012; Vijayakumar *et al.*, 2011). De los brotes en las Américas, se han descrito a detalle los brotes de Colombia, Granada y Trinidad y Tobago (Macpherson *et al.*, 2016; Mattar *et al.*, 2015; Sahadeo *et al.*, 2015). Típicamente, el inicio de la fiebre es abrupto e incluye los siguientes síntomas: fiebre, poliartralgia severa, dolor de cabeza, dolor de espalda y mialgias. La fiebre es generalmente el primer síntoma en aparecer; los otros síntomas le siguen dentro de unos pocos días. La artralgia usualmente afecta más de una articulación, de las cuales las más afectadas son las rodillas, tobillos, manos y muñecas. Los síntomas generalmente se resuelven dentro de 7-10 días, aunque el dolor articular puede durar semanas, meses o inclusive años.

Los análisis de laboratorio clínico durante la infección a CHIKV han sido reportados en varios brotes. Los resultados más significativos en pacientes positivos son la linfopenia, leucopenia, hipocalcemia y las transaminasas elevadas; pero estos resultados no han sido consistentes en todos los estudios y depende mucho de la fase clínica de la infección (Borgherini *et al.*, 2007; Sahadeo *et al.*, 2015; Staikowsky *et al.*, 2009; Thiberville, Boisson, *et al.*, 2013). Las variaciones clínicas pudieran ser explicadas debido a las respuestas inmunopatogénicas únicas de los dos linajes epidémicos de CHIKV. Ha sido reportada evidencia de una menor virulencia y patogenicidad del linaje asiático del Caribe comparado con el linaje del Océano Índico (derivado del linaje ECSA) a partir de un modelo de infección murino (Teo *et al.*, 2015).

El buen pronóstico de la presentación clínica de CHIKF basado en los linajes/genotipos de CHIKV ha sido pobremente discutido. Este estudio pretendió de documentar y describir las características clínicas y de laboratorio de un brote de CHIKV

causado por el linaje asiático del Caribe en México. Además, se compararon las descripciones clínicas de los brotes causados por los linajes ECSA-IOL y asiático alrededor del mundo con los resultados de este estudio. Para lograr esto, se condujo un estudio observacional de corte en un hospital de segundo nivel en la ciudad de Tapachula, Chiapas, México, donde casos probables de CHIKV fueron reclutados y luego diagnosticados por pruebas moleculares y serológicas. Adicionalmente, la sintomatología clínica fue registrada para cada paciente enrolado y luego se efectuaron los análisis de laboratorio para obtener datos biológicos relevantes relacionados a la infección por CHIKV.

MATERIAL Y MÉTODOS

Área y población de estudio

Un estudio observacional de corte fue llevado a cabo entre diciembre del 2014 a junio del 2015 en la clínica hospital “Dr. Roberto Nettel” localizado en la ciudad de Tapachula (14°56’ N, 92°17’ W), Chiapas, estando 15km cerca de la frontera México-Guatemala. Este hospital atiende pacientes de la región del Soconusco, compuesto por Tapachula y otros 15 municipios: Metapa, Acapetahua, Acacoyagua, Escuintla, Frontera Hidalgo, Huehuetán, Huixtla, Unión Juárez, Mazatán, Cacahoatán, Villa Comatitlán, Suchiate, Tuxtla Chico, Tuzantán y Mapastepec (Figura 1B). Esta región tiene una población de 728,647 habitantes y esta región es endémica a la fiebre por dengue (DENV) (Dantés *et al.*, 2014; Secretaría de Hacienda del Estado de Chiapas, 2012).

El hospital “Dr. Roberto Nettel” pertenece al ISSSTE (Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado), y solo atiende trabajadores del Estado y sus familiares inmediatos quienes representan el 4.5% del total de la población de la región del Soconusco (Sistema Nacional de Información Municipal, 2010). Los pacientes quienes fueron admitidos a este hospital fueron incluidos en el estudio si sus síntomas clínicos cumplieron el criterio de inclusión para un paciente sospechoso de CHIKF: inicio con fiebre aguda $>38.5^{\circ}\text{C}$ acompañado por artralgia severa no explicada por otra condición médica en un paciente que reside en áreas epidémicas (PAHO, 2011). Los criterios de exclusión fueron si el paciente se negó a participar en el estudio o fue reportado como positivo a DENV por RT-PCR o ELISA por el Laboratorio Estatal de la Secretaría de Salud de Chiapas.

Consideraciones de bioética

Este estudio formó parte del protocolo “Emergencia del virus de chikungunya (CHIKV): tendencias en patrones epidemiológicos, incriminación de vectores, y filogenia de variantes genéticas en Chiapas, México” aprobado por las comisiones de bioética, bioseguridad e investigación del Instituto Nacional de Salud Pública (Proyecto #1312 y aprobación #1738) (Anexo 1). Los pacientes fueron enrolados al estudio durante un brote de CHIKV, y las muestras de sangre fueron colectadas como parte de un análisis de laboratorio rutinario de los pacientes admitidos al hospital “Dr. Roberto Nettel”. Por lo tanto, solo un consentimiento oral para participar en el estudio fue obtenido de cada paciente. Toda la

información pertinente sobre el estudio (propósito, procedimientos, riesgos, beneficios, alternativas de participación, etc.) fueron explicados a los potenciales participantes en la presencia de un testigo independiente, y cada paciente que estuvo de acuerdo en participar fue registrado en el formato de estudio epidemiológico.

Muestreo y encuesta epidemiológica básica

Después de la inclusión, una examinación clínica fue realizada por un médico del hospital siguiendo el formato de estudio epidemiológico para CHIKV (Anexo 3). Este formato colecta la información de presencia y ausencia de los siguientes síntomas: fiebre, poliartralgia, artritis, dolor de cabeza, mialgia, edema, exantema (rash), adenopatías, dolor retroorbital, alteraciones digestivas (vómito, diarrea y náusea), etcétera. Para evitar alguna confusión entre poliartralgia y artritis, se diferenciaron siendo la primera un dolor articular transitorio, intermitente o persistente mientras que la segunda es la inflamación de una o más articulaciones. También se incluye datos epidemiológicos adicionales del paciente tales como edad, género e historia de migración.

Después de la examinación clínica, el médico llenó el formato por paciente y después colectó tres muestras de sangre de cada paciente: un tubo con EDTA para el análisis de biometría hemática, un tubo con citrato para los análisis de coagulación y otro tubo “seco” para el resto de las pruebas de laboratorio, incluyendo el diagnóstico. El suero se obtuvo de los tubos “secos” a partir de una centrifugación a 3,000 rpm para después hacer alícuota que se almacenaron a -80°C para el diagnóstico molecular y serológico.

Análisis de laboratorio clínico

Los parámetros hematológicos que se incluyeron fueron eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), leucocitos, cuenta diferencial de leucocitos (%), volumen plaquetario medio (VPM) y amplitud de distribución eritrocitaria (ADE). Estos parámetros fueron determinados utilizando el analizador hematológico Advia®120 (Siemens Healthcare Diagnostics, Erlangen, Alemania). Otros parámetros, incluyendo el tiempo de protrombina (TP), tiempo parcial de tromboplastina (TPT) y fibrinógeno, fueron determinados utilizando el analizador de coagulación IL ACL Elite PRO (Diamond® Diagnostics, Holliston, MA).

Los análisis para la función hepática fueron determinados midiendo la aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa), fosfatasa alcalina (alkaline phosphatase, ALP), lactato deshidrogenasa (LDH), γ -glutamilttransferasa (GGT), proteína total (PT), albúmina, globulinas, relación albúmina/globulina (A/G), bilirrubina total (BT), bilirrubina directa (BD) y bilirrubina indirecta (BI) utilizando el equipo Integrated Chemistry System Dimension RxL Max® (Siemens Healthcare Diagnostics, Erlangen, Alemania). Otros parámetros bioquímicos, incluyendo glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, triglicéridos, colesterol total, electrolitos en suero (sodio, cloro y potasio) y el marcador inflamatorio proteína C-reactiva (PCR) fueron medidos utilizando el equipo Dimension RxL Max®.

Diagnóstico serológico y molecular mediante las técnicas de ELISA y qRT-PCR

La extracción del ARN se efectuó a partir de 140 μ L de suero de cada muestra utilizando el estuche comercial QIAmp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) de acuerdo con el protocolo del fabricante (Anexo 9). El diagnóstico molecular de CHIKV se realizó bajo la técnica de RT-PCR Tiempo real, utilizando el estuche comercial QuantiTect Probe RT-PCR kit (QIAGEN catálogo #204443). La técnica se realizó de acuerdo a lo estandarizado para el linaje asiático en el Centro de Control de Enfermedades (CDC) (Johnson *et al.*, 2016). Para cada reacción, se tomaron 40 μ L de la mezcla de reacción junto con 10 μ L del ARN proveniente de una muestra de suero. Cada muestra se realizó por duplicado y se incluyeron siempre dos controles negativos y dos positivos. El equipo utilizado para las reacciones fue el 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). El protocolo completo que incluye los iniciadores junto con la sonda marcada con el fluoróforo FAM, las condiciones de la reacción, el programa de ciclos para el termociclador tiempo real y los valores de interpretación se encuentran en el Anexo 10.

Además, se efectuó la técnica de ELISA para detectar la presencia de anticuerpos IgM con el estuche comercial CHIKjj Detect MAC-ELISA (InBios, Inc., Seattle, WA). (Erasmus *et al.*, 2015). A partir de una alícuota de suero de un paciente, se tomaron 4 μ L para hacer una dilución 1:100 completando a 400 μ L en un pozo de la placa, cada una de las muestras por duplicado. Después se siguió el protocolo del fabricante, utilizando 3 repeticiones para el control positivo y 3 repeticiones para el control negativo (Anexo 6). El equipo utilizado para efectuar las el diagnóstico serológico fue el lector de placas Statfax 3200 ELISA reader

(Awariness®, Ramsey, MN). Para el diagnóstico de dengue, parte de las muestras fueron enviadas por separado al Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Chiapas. El suero fue analizado con los estuches comerciales Panbio® Dengue Early ELISA y Panbio® Dengue IgM Capture ELISA (Alere, Waltham, MA) para la detección de los antígenos NS1 y anticuerpos IgM de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Análisis de datos

Los pacientes confirmados a CHIKF fueron separados en dos categorías que representaron las dos etapas de la enfermedad que se observaron en este estudio: virémicos (positivos a qRT-PCR) y post-virémicos convalecientes (positivos a IgM). Se realizaron análisis univariados para saber conocer la relación de la infección de CHIKV entre los grupos de edad y el sexo, utilizándose la prueba de bondad de ajuste con distribución χ^2 y la comparación de proporciones con distribución Z, respectivamente. Para hacer las comparaciones entre estas dos etapas de la enfermedad con las diferentes variables clínicas y de laboratorio, se efectuaron análisis bivariados utilizando la prueba de Mann-Whitney para variables continuas y la prueba de χ^2 de Pearson o la prueba exacta de Fisher para variables categóricas, considerando valores significativos de $p < 0.05$. El programa estadístico utilizado para realizar los análisis fue el Minitab 17® (State College, PA).

RESULTADOS

La secretaría de Salud reportó 2,500 casos probables de chikungunya en 10 municipios de la región del Soconusco (Figura 1A) de noviembre del 2014 a junio del 2015, de los cuales 850 fueron admitidos por el hospital “Dr. Roberto Nettel”. De estos pacientes, solo 112 aceptaron entrar al estudio (Figura 22). Los datos clínicos, epidemiológicos y de laboratorio fueron obtenidos de cada participante; y ninguno fue excluido por falta de datos. Noventa y cinco pacientes (84.8%) fueron confirmados a la infección por CHIKV, de los cuales 62 (65.3%) fueron +qRT-PCR y 33 (34.7%) fueron +IgM / -qRT-PCR, mientras que los restantes 17 pacientes (15.2%) fueron negativos a CHIKV (Figura 22). Solamente un paciente fue positivo a qRT-PCR e IgM, y fue categorizado como un caso virémico en el subsecuente análisis de datos. Ninguno de los casos incluidos en el estudio fue confirmado a DENV por el laboratorio Estatal de Salud Pública. Los casos confirmados a CHIKV de este estudio estuvieron distribuidos a lo largo de nueve municipios, teniendo 39 casos (41.0%) en Tapachula, 17 (17.9%) en Tuxtla Chico, 17 en Huehuetán (17.9%) y 11 en Cacahoatán (11.6%) (Figura 1D).

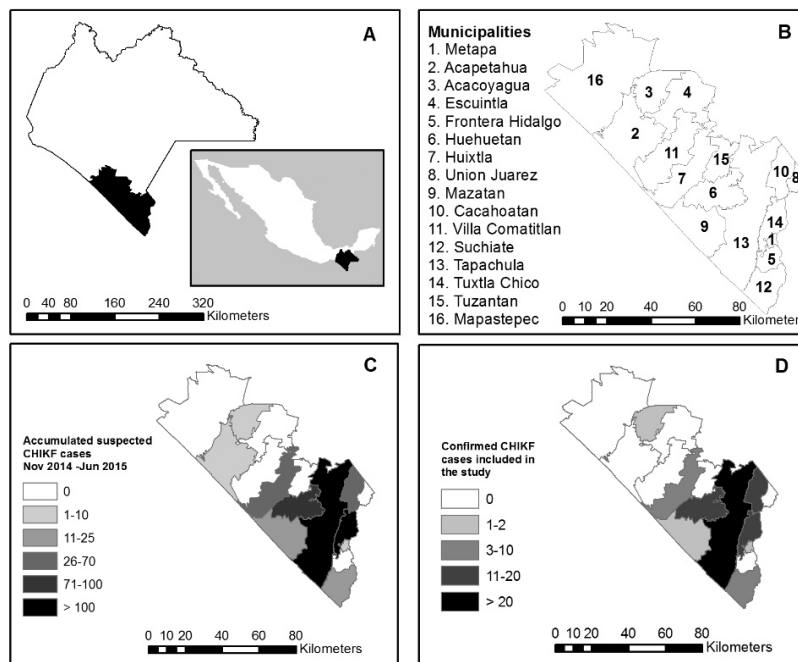


Figura 21. Área de estudio del estudio observacional de corte de pacientes infectados a CHIKV atendidos en el hospital “Dr. Roberto Nettel”, noviembre 2014-junio 2015. A. Región del Soconusco, Chiapas, sombreada de negro. B. Municipios de la región del Soconusco, Chiapas. C. Casos sospechosos acumulados de CHIKF en la región del Soconusco, noviembre 2014-junio 2015. D. Casos confirmados de CHIKF incluidos en el estudio, diciembre 2014-junio 2015.

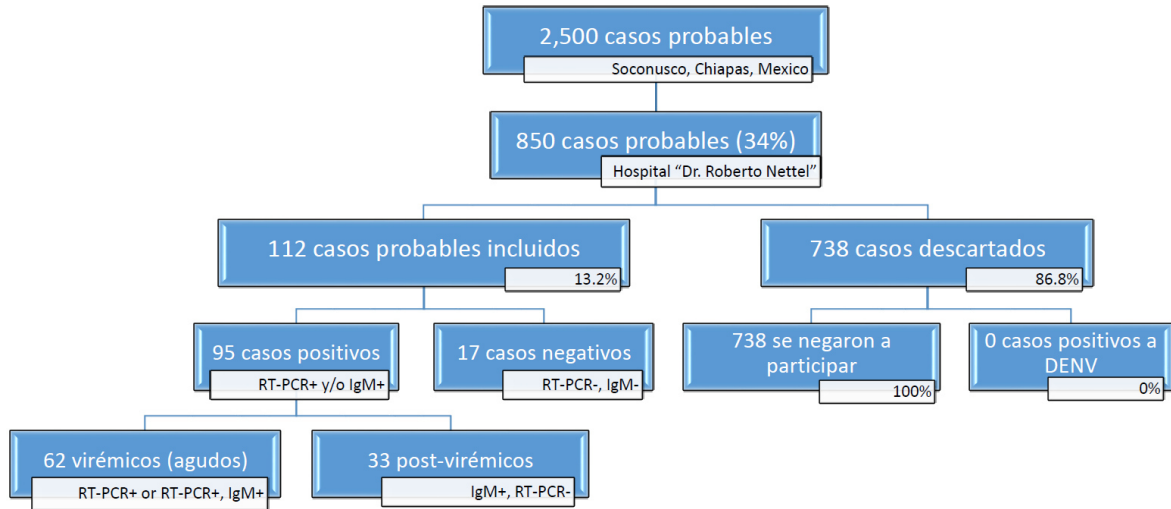


Figura 22. Enrolamiento de pacientes de los pacientes sospechosos a CHIKV en el hospital “Dr. Roberto Nettel”, diciembre 2014-junio 2015, Tapachula, Chiapas.

Los datos demográficos de los 95 pacientes confirmados a CHIKV están mostrados en la Tabla 4. Las medianas de edades de los pacientes fueron muy similares, siendo 39.5 y 39.0 para los pacientes virémicos y post-virémicos, respectivamente ($p>0.05$). Aunque la distribución de las edades no mostró diferencia significativa alguna, la mayoría de los pacientes fueron mayores de 30 años (69.5%), sin embargo, los menores de 20 años solo fueron 12% de los casos confirmados en ambas fases de la enfermedad. Además, la distribución de sexos fue desigual; siendo el 71.6% de los pacientes del género femenino ($p<0.05$) (Tabla 4).

Datos de la población	Virémicos (+qRT-PCR)		Post-virémicos (+IgM)		Total		Valor <i>p</i> entre fases	Valor <i>p</i> entre grupos
	Mediana	IC 95%	Mediana	IC 95%	Mediana	IC 95%		
Edad	39.5	33.5-41.5	39.0	34.0-45.0	38.5	35.0-41.5	0.628	-
Grupos de edad	N	%	N	%	N	%		
0-20 años	8	12.9	4	12.1	12	12.6	0.997	0.177
21-30 años	10	16.1	5	15.2	15	15.8		
31-40 años	13	21.0	8	24.2	21	22.1		
41-50 años	18	29.0	9	27.3	27	28.4		
>50 años	13	21.0	7	21.2	20	21.1		
Sexo	N	%	N	%	N	%		
Mujeres	44	71.0	24	72.7	68	71.6	0.856	<0.001
Hombres	18	29.0	9	27.3	27	28.4		

Tabla 4. Datos demográficos de los 95 pacientes confirmados a la infección por CHIKV en el hospital “Dr. Roberto Nettel”, Tapachula, Chiapas, diciembre 2014-junio 2015

Una descripción clínica detallada de los pacientes virémicos y post-virémicos está descrita en la Tabla 5. El tiempo que pasó entre el inicio de síntomas y la consulta (ISC) al hospital “Dr. Roberto Nettel” fue un asunto importante considerado en este estudio. La mediana de días entre ICS fue de 3.0 y 4.0 para los pacientes virémicos y post-virémicos, respectivamente, siendo ambos estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). A pesar del poco tiempo de diferencia entre ICS en ambas fases, se observaron interesantes diferencias significativas en los síntomas clínicos y análisis de laboratorio entre ambas fases de la enfermedad.

Los síntomas más comunes registrados durante la fase virémica fueron la fiebre (100%), dolor de cabeza (82.3%), exantema (rash) (82.3%), escalofríos (82.3%), poliartralgia severa (71.0%) y náusea (71.0%). Otros síntomas ocasionalmente observados en esta fase fue el prurito (66.1%), artritis (58.1%), dolor abdominal (46.8%), edema (43.5%), diarrea (33.9%) y poliartralgia moderada o leve (29.0%) (Tabla 5). Por otro lado, los síntomas más frecuentes descrito en los pacientes post-virémicos fue el dolor de cabeza (87.9%), exantema (81.8%), escalofríos (75.8%), poliartralgia moderada o leve (51.5%) y náuseas (48.5%). Otros síntomas que se desarrollaron fue la artritis (78.8%) y las adenopatías (60.6%).

Los únicos síntomas que mostraron diferencias significativas entre ambas fases de la enfermedad fue la poliartralgia severa, poliartralgia moderada o leve, artritis, adenopatía y náusea (Tabla 5). En los pacientes virémicos, se observaron mayores porcentajes de pacientes con poliartralgia severa (71.0%) y náuseas (71.0%) que en los pacientes post-virémicos (48.5% y 48.5%, respectivamente). En cambio, en los pacientes post-virémicos se observaron mayores porcentajes de pacientes con poliartralgia moderada o leve (51.5%), artritis (78.8%) y adenopatías (60.6%) que en los pacientes virémicos (29.0%, 58.1% y 33.9%, respectivamente).

Con respecto a los análisis de laboratorio clínico, las muestras de sangre fueron analizadas para los diferentes parámetros: biometría hemática, pruebas de coagulación, carbohidratos, lípidos, electrolitos, marcadores inflamatorios y función hepática y renal. Estas pruebas fueron realizadas para encontrar alguna alteración causada por la infección a CHIKV en los pacientes virémicos y post-virémicos, y los resultados se muestran en la figura 23.

	Virémico (+qRT-PCR)		Post-virémico (+IgM)		Valor <i>p</i>
	Mediana	IC 95%	Mediana	IC 95%	
Días entre inicio de síntomas y consulta (ISC)	3.0	2.0-3.0	4.0	2.0-4.0	0.048
Síntomas clínicos					
	N	%	N	%	
Fiebre	62	100.0	33	100.0	-
Dolor de Cabeza	51	82.3	29	87.9	0.565
Mialgia	4	6.5	0	0.0	-
Poliartralgia moderada o leve	18	29.0	17	51.5	0.031*
Poliartralgia severa	44	71.0	16	48.5	0.032*
Artritis	36	58.1	26	78.8	0.043*
Dolor retroorbital	9	14.5	3	9.1	-
Exantema (rash)	51	82.3	27	81.8	0.958
Prurito	41	66.1	26	78.8	0.198
Vómito	11	17.7	1	3.0	-
Náusea	44	71.0	16	48.5	0.031*
Escalofríos	51	82.3	25	75.8	0.451
Fotofobia	1	1.6	0	0.0	-
Dolor abdominal	29	46.8	12	36.4	0.327
Diarrea	21	33.9	14	42.4	0.412
Conjuntivitis	10	16.1	5	15.2	0.901
Congestión nasal	9	14.5	9	27.3	0.138
Tos	9	14.5	4	12.1	0.746
Faringitis	11	17.7	5	15.2	0.748
Esplenomegalia	1	1.6	0	0.0	-
Alteración del gusto	49	79.0	23	69.7	0.312
Adenopatía	21	33.9	20	60.6	0.012*
Inflamación del párpado	4	6.5	1	3.0	-
Disnea	4	6.5	1	3.0	-
Alteración cardíaca	1	1.6	0	0.0	-
Debilidad muscular	15	24.2	5	15.2	0.303
Petequias	0	0.0	1	3.0	-
Edema	27	43.5	17	51.5	0.458
Sangrado	3	4.8	2	6.1	-

Tabla 5. Características clínicas de los 95 pacientes confirmados atendidos por el hospital “Dr. Roberto Nettel”, Tapachula, Chiapas, diciembre 2014-junio 2015. *significativo cuando $p < 0.05$.

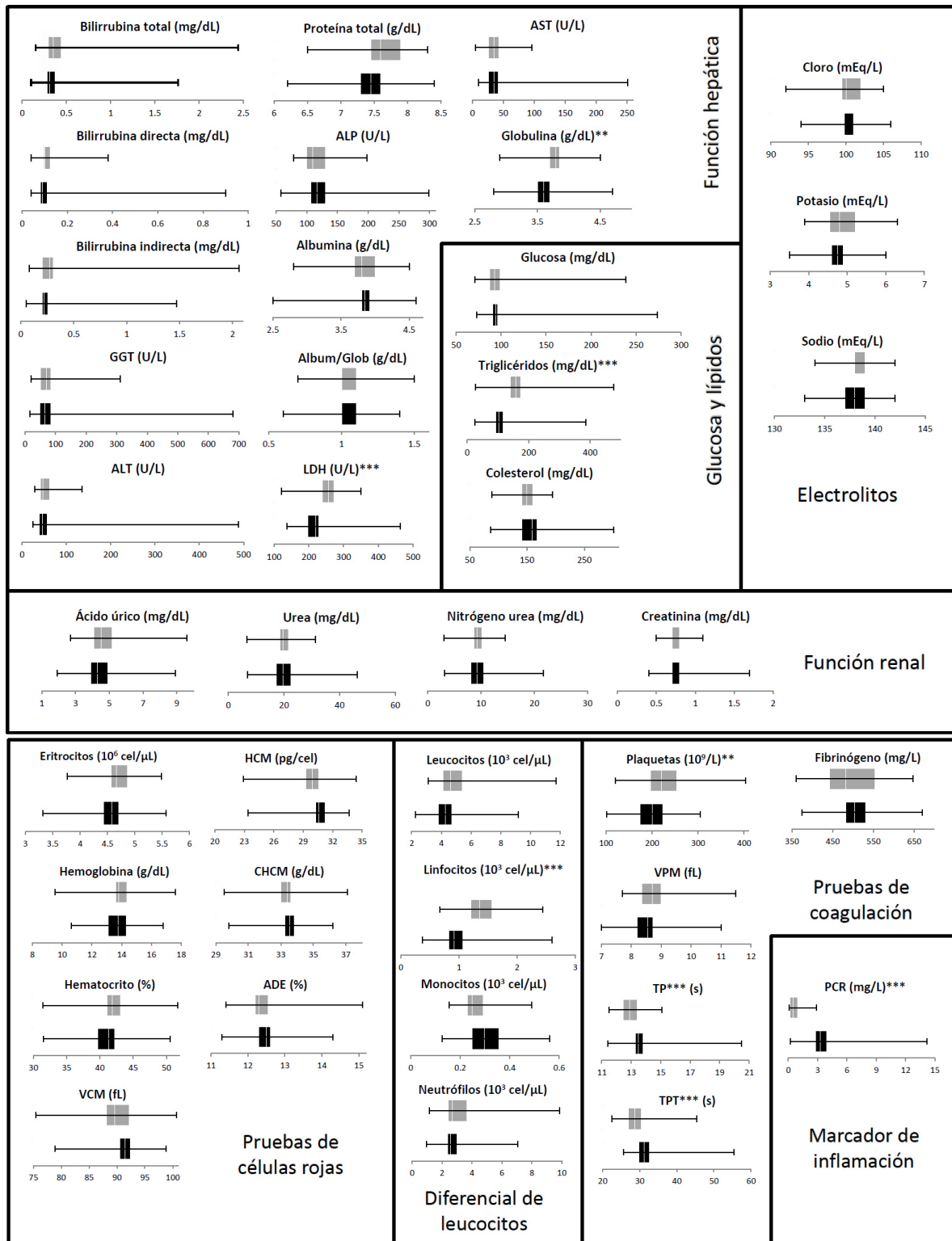


Figura 23. Valores de los análisis de laboratorio para la función hepática y renal, glucosa, lípidos, electrolitos, biometría hemática, diferencial de leucocitos, pruebas de coagulación y marcador de inflamación de 95 casos de CHIKF confirmados enrolados en este estudio. Las barras grises representan los pacientes virémicos, mientras que los negros los pacientes post-virémicos. Valores de probabilidad: ** $0.05 > p > 0.01$; *** $p < 0.01$.

La mayoría de los parámetros analizados en este estudio cayeron dentro de los rangos normales en ambas fases de la enfermedad excepto: enzimas hepáticas (AST, ALT, ALP), cuenta absoluta de leucocitos, linfocitos, LDH y PCR. De estos parámetros, sin embargo, solamente se encontraron diferencias significativas en la cuenta de linfocitos, LDH, y niveles de PCR. Aunque se encontraron diferencias significativas entre los triglicéridos, TP y TPT, estos resultados no fueron relevantes porque la mayoría de los valores estuvieron dentro de los rangos normales (Figura 23).

La tabla 6 demuestra las anormalidades en valores de laboratorio relevantes e incluye sus respectivos valores de referencia. Una elevada concentración de enzimas hepáticas (AST, ALT y ALP) fueron observadas en un 30.6-48.4% y 24.4-42.4% en pacientes virémicos y post-virémicos, respectivamente, no encontrándose diferencias significativas entre las diferentes etapas de la enfermedad en cada una de las enzimas. En cambio, donde se encontraron diferencias significativas fueron en los porcentajes de linfopenia, LDH e hiperkalemia. En los pacientes virémicos, se observó mayor porcentaje de pacientes con linfopenia (56.5%) que en pacientes post-virémicos (12.1%), mientras que en los pacientes post-virémicos se observó un mayor porcentaje de pacientes con altos niveles de LDH (69.7%) y con hiperkalemia (36.4%) que en pacientes virémicos (33.9% y 16.1%, respectivamente). La PCR estuvo elevada en la fase virémica de la infección (61.0%) pero luego los valores cayeron en rangos normales en todos los pacientes seropositivos (Tabla 6).

	Virémicos		Post-virémicos		Valor <i>p</i>
	N	%	N	%	
Alta AST (>37 U/L)	30	48.4	14	42.4	0.579
Alta ALT (>65 U/L)	19	30.6	11	33.3	0.789
Alta ALP (>136 U/L)	21	33.9	8	24.2	0.327
Alta GGT (>85 U/L)	23	37.1	10	30.3	0.508
Alta LDH (>234 U/L)	21	33.9	23	69.7	0.001*
Baja relación A/G (<1.2)	44	71.0	27	81.8	0.247
Leucopenia (<4500 cells/mm³)	34	54.8	15	45.5	0.384
Linfopenia (<1000 cells/mm³)	35	56.5	4	12.1	<0.001*
Monocitopenia (<200 cells/mm³)	13	21.0	4	12.1	0.401
Trombocitopenia (<100 x 10³ platelets/mm³)	11	17.7	5	15.2	0.366
Bajo hematocrito (<40.0%)	25	40.3	8	24.2	0.117
Alta PCR (>3 mg/dL)	38	61.3	0	0%	-
Hiponatremia (<136 mEq/L)	9	14.5	5	15.2	0.934
Hiperkalemia (>5.1 mEq/L)	10	16.1	12	36.4	0.026*

Tabla 6. Anormalidades bioquímicas, electrolíticas y hematológicas de 95 pacientes confirmados a CHIKF, Hospital “Dr. Roberto Nettel”, diciembre 2014-junio 2015, Tapachula, Chiapas.

DISCUSIÓN

En la frontera sur de México, donde el virus chikungunya ingresó por primera vez a nuestro país en octubre del 2014 y fue reportado oficialmente hasta el mes de noviembre del mismo año, se realizó un estudio observacional de corte donde se evaluaron clínicamente a 112 pacientes con síntomas concernientes para CHIKF, confirmándose 95 casos por qRT-PCR y ELSA. De estos pacientes, se analizaron los datos generados de la sintomatología clínica y los análisis de laboratorio clínico. Los resultados clave fueron: 1) de los 112 casos probables de CHIKF, 95 casos (84.8%) fueron confirmados por qRT-PCR (33) o IgM ELISA (62) siendo los adultos mayores de 30 años y mujeres los más afectados; 2) fiebre, poliartralgia, exantema y dolor de cabeza fueron los síntomas más comunes observados en los pacientes, sin embargo, las adenopatías que no habían sido descritas a profundidad en brotes previos, se encontraron en este estudio, 3) durante el inicio de la enfermedad, la sintomatología entre los brotes causados por el linaje IOL y este brote causado por el linaje asiático parece ser muy similar y 4) las anomalías biológicas observadas durante la infección a CHIKV fueron la linfopenia, leucopenia, elevadas transaminasas, elevada LDH y PCR.

Comparando los resultados obtenidos en este estudio con los reportes epidemiológicos de otros brotes (Anexo 11), seis de nueve estudios encontraron una media o mediana de edad de pacientes infectados entre los 30-40 años, lo cual es similar a nuestro estudio con una mediana de 38.5 días. Además, en los nueve estudios se reportaron bajas frecuencias de pacientes infectados en menores, tal como se observó en nuestro estudio. Sin embargo, en un brote de CHIKV en Tanzania, asociaron que los infantes tienen un mayor factor de riesgo a la infección por CHIKV (Hertz *et al.*, 2012). Es posible que los menores tengan menor riesgo a la infección a CHIKV en el resto de los brotes y en nuestro estudio, y en el caso de Tanzania, otros factores estén involucrados como, por ejemplo, la desnutrición y la alta prevalencia de VIH. En cambio, solamente dos brotes de la Isla de la Reunión reportaron que los adultos mayores de 50 años fueron los más afectados. La falta de inmunidad en la región puede explicar por qué las infecciones de CHIKV son relativamente uniformes en la mayoría de los grupos de edad, sobre todo en los adultos (Gérardin *et al.*, 2008).

La relación de hombres/mujeres en casos confirmados por CHIKV ha variado. Mientras que en los brotes de la Isla de la Reunión (2006), Sri Lanka (2007) y Singapur (2008) (Reller *et al.*, 2013; Thiberville, Boisson, *et al.*, 2013; Win *et al.*, 2010) encontraron una mayor proporción de hombres afectados, los brotes en el continente americano y nuestro estudio encontraron una mayor proporción de mujeres infectadas (Macpherson *et al.*, 2016; Mattar *et al.*, 2015; Sahadeo *et al.*, 2015). Un muestreo sesgado puede explicar las diferencias entre estos estudios, por ejemplo, en el brote de Singapur se seleccionaron más inmigrantes trabajadores hombres; y en los brotes de La Reunión, Colombia y Trinidad y Tobago tuvieron bajos números de participantes, sugiriendo que sus resultados no son representativos para la población en general. La muestra de pacientes de este estudio tampoco es representativa, ya que solamente se estudió la población de los trabajadores del Estado (derechohabientes del ISSSTE), además se encontró una diferencia significativa en la relación hombre/mujer entre el total de casos probables y de los pacientes enrolados, siendo de 0.53 (850 total casos probables) y 0.40 (casos enrolados 112), respectivamente ($p < 0.05$). A pesar de esto, es importante considerar que la transmisión de CHIKV pudiera haber ocurrido más en entornos domiciliarios poniendo a las amas de casa en mayor riesgo de infección, tal como ha sido descrito en reportes previos de seroprevalencia de dengue en México (Amaya-Larios *et al.*, 2014).

Los síntomas más comúnmente reportados en todos los estudios previos, incluyendo éste, fueron fiebre (80-100%), poliartralgia (80-100%), dolor de cabeza (50-80%), exantema (rash) (30-70%) y alteraciones digestivas (20-80%). La adenopatía, artritis y edema son raramente encontrados en estos estudios. Es importante resaltar que el exantema fue muy alta (82.3%) en nuestro estudio comparado con el resto de los estudios en donde el valor más alto fue hasta el 50% (World Health Organization, 2008).

Las linfadenopatías cervicales fueron observadas en brotes de CHIKF de la India y en casos españoles importados, así como también en pacientes afectados por el virus O'nyong-nyong, un alfavirus relacionado (Keny *et al.*, 2014; Kiwanuka *et al.*, 1999; Norman *et al.*, 2015). Interesantemente, durante el brote de la isla de La Reunión durante 2005-2006, un incremento en las adenopatías fue observado desde un 8.9% en la fase virémica hasta un 29.0% en la fase post-virémica, similar en nuestro estudio que fue desde un 33% en la fase

virémica hasta un 60.6% en la fase post-virémica. La ocurrencia de las linfadenopatías posiblemente pudieron haber sido sub-diagnosticados en el resto de los estudios, ya que estas suelen ocurrir hacia al final de la fase febril y durante la recuperación de la infección, y parecen ser autolimitantes (Norman *et al.*, 2015). Desafortunadamente, la ubicación específica de las adenopatías no ha sido registrada en la mayoría de los estudios y tampoco fue así en este estudio. Respecto a la artritis y el edema, la falta de suficientes datos hace difícil determinar la prevalencia de estos síntomas.

Los datos que incluyen los genotipos de los brotes de la isla de La Reunión, Singapur, Gabón, Sri Lanka, Colombia y Trinidad están en el Anexo 11. Aunque se ha reportado que el linaje asiático del Caribe es menos virulento que el linaje IOL (Teo *et al.*, 2015), el brote por el linaje asiático de Chiapas y el resto de los brotes por el linaje IOL alrededor del mundo parece comportarse clínicamente similar durante los primeros 3-4 días de la infección.

La función hepática fue evaluada en este estudio midiendo los niveles de las enzimas AST, ALT y ALP. Estudios de los brotes de La Reunión y de Gabón reportaron elevaciones de estas enzimas en aproximadamente 20-46% de los casos teniendo niveles de la AST hasta 55 y 53.2 U/L en pacientes virémicos y post-virémicos, respectivamente. Los resultados obtenidos en este estudio son muy similares reportados en la literatura, pero este incremento puede ser explicado por el uso de paracetamol y/o ibuprofeno para el tratamiento sintomático, produciendo una toxicidad transitoria en el hígado (Nkoghe *et al.*, 2012).

Otro parámetro biológico que ha sido asociado a la infección por CHIKV es el nivel elevado de la proteína C-reactiva. Estudios previos del brote de La Reunión reportaron niveles altos de PCR en aproximadamente 50-70% de los casos confirmados con niveles en suero hasta de 5.6 mg/L, siendo similar a los niveles observados en este estudio en un 61.3%. Adicionalmente, otra enzima que se observó elevada fue la LDH en pacientes post-virémicos. Esto ha sido observado previamente (Parola *et al.*, 2006; Win *et al.*, 2010) y puede ser explicado porque esta enzima es liberada al medio extracelular durante el daños celular asociado a la inflamación (Ede *et al.*, 2013)

Los parámetros de las biometrías hemáticas que estuvieron anormalmente inferiores durante la infección por CHIKV fue la cuenta absoluta de leucocitos y linfocitos, las cuales ocurrieron en un 54.8% y 56.5% de los casos, respectivamente. En los casos post-virémicos, la leucopenia persistió en un 45.5% mientras que la linfopenia disminuyó a un 12.1%. Solamente la linfopenia fue reportada en un 70-80% de los casos confirmados en los brotes de La Reunión, con cuentas de 608 células/mm³ durante la fase virémica. La leucocitosis ha sido asociada a infecciones de CHIKV (Laoprasopwattana *et al.*, 2012; Taraphdar *et al.*, 2012); sin embargo, ninguno de los estudios citados aquí ni en nuestro estudio encontraron un incremento significativo en la cuenta de células blancas.

Deben ser consideradas las limitaciones en este estudio. La muestra obtenida estuvo sesgada ya que solamente se seleccionaron pacientes de un sector poblacional y en un único hospital, debido a la facilidad de obtener las muestras de esta clínica, por lo tanto, no se puede considerar la muestra como representativa de toda la población general. Otra fuente de sesgo pudo haber sido durante el enrolamiento de los participantes. La relación hombre/mujer fue diferente entre todos los pacientes registrados en el hospital “Dr. Roberto Nettel” y los participantes enrolados al estudio. La mayoría de los brotes previos también han tenido limitaciones similares en la colección de la muestra poblacional, pero también fueron capaces de encontrar información clínicamente significativa tal como en este estudio.

CONCLUSIONES

Capítulo 1

- El virus chikungunya emergió en el mes de octubre del 2014 en las comunidades de Ciudad Hidalgo y el ejido “La Libertad” ubicados en el municipio de Suchiate, Chiapas, frontera con Guatemala.
- A partir de este brote, se confirmaron 59 casos a la infección por CHIKV, teniendo los principales síntomas: fiebre, poliartralgia, dolor de cabeza y exantema (rash).
- En la localidad de Ciudad Hidalgo se encontraron más mujeres infectadas (71.0%) que hombres (29.0%), mientras que en el ejido “La Libertad”, los pacientes más afectados fueron adultos de 45 años o más.
- La migración proveniente de Centroamérica pudo haber jugado un papel clave en el ingreso de CHIKV a México.

Capítulo 2

- El mosquito *Aedes aegypti* fue el principal vector de CHIKV durante el brote de octubre – noviembre del 2014 en el municipio de Suchiate, Chiapas.
- La alta presencia de vectores en los domicilios (80.0%) y falta de inmunidad de rebaño pueden explicar la alta tasa de infección de 32.26/1000 mosquitos observados durante el brote.
- El linaje asiático fue el que circuló en vectores y en casos humanos durante el brote de Ciudad Hidalgo, Suchiate, Chiapas, guardando relación con las secuencias obtenidas de los brotes de las Islas Vírgenes Británicas y Guatemala, reforzando el rol de la migración en el ingreso de CHIKV a México.

Capítulo 3

- Durante el brote de CHIKV en el Soconusco de noviembre 2014 – junio 2015, se incluyeron 112 pacientes probables a tener fiebre chikungunya en el hospital “Dr. Roberto Nettel”, de los cuales fueron confirmados 95 (84.8%), siendo positivos 62 (65.3%) a qRT-PCR (virémicos) y 33 (34.7%) a ELISA IgM (post-virémicos).
- Los síntomas más comunes durante la fase virémica fueron fiebre (100%), exantema (82.3%), escalofríos (82.3%), dolor de cabeza (82.3%) y poliartralgia severa (71.0%),

mientras que en la fase post-virémica los síntomas más comunes fueron fiebre (100%), dolor de cabeza (87.9%), exantema (81.8%), prurito (78.8%), adenopatías (60.6%) y poliartralgia moderada o leve (51.5%).

- Las alteraciones más comunes en los parámetros de los análisis de laboratorio fueron en la fase virémica altos niveles de PCR y linfopenia, mientras que en la fase post-virémica fueron altos niveles de LDH.
- La presencia de adenopatías fue encontrada en este estudio y era un síntoma clínico poco observado en brotes previos de CHIKV.

PERSPECTIVAS

Este trabajo abre las puertas a diferentes líneas de investigación con referente al virus chikungunya:

1. Análisis de las variantes genéticas que están circulando en México para conocer la historia evolutiva de este virus en nuestro país.
2. Búsqueda del potencial rol que pueda tener *Ae. albopictus* como vector de CHIKV, tanto como detección de infecciones naturales como el análisis de las secuencias virales para búsqueda de nuevas mutaciones adaptativas para este vector.
3. Proposición de estudios epidemiológicos más sofisticados, por ejemplo, estudios de casos y controles con tamaños de muestra más amplios para asociar diferentes factores de riesgo a la infección por CHIKV.
4. Estudios epidemiológicos longitudinales para medir el efecto crónico de la infección por CHIKV.

BIBLIOGRAFÍA

- Albuquerque, I. G. C. de, Marandino, R., Mendonça, A. P., Nogueira, R. M. R., Vasconcelos, P. F. da C., Guerra, L. R., ... Bacco, P. A. M. de. (2012). Chikungunya virus infection: report of the first case diagnosed in Rio de Janeiro, Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45(1), 128–129. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822012000100026>
- Amaya-Larios, I. Y., Martínez-Vega, R. A., Mayer, S. V., Galeana-Hernández, M., Comas-García, A., Sepúlveda-Salinas, K. J., ... Ramos-Castañeda, J. (2014). Seroprevalence of neutralizing antibodies against dengue virus in two localities in the state of Morelos, Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(5), 1057–65. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0145>
- Anthony, R. P., & Brown, D. T. (1991). Protein-protein interactions in an alphavirus membrane. *J. Virol.*, 65(3), 1187–1194. Retrieved from <http://jvi.asm.org/cgi/content/long/65/3/1187>
- Aquino Rojas, E., Rojas Cortez, M., Espinoza, J., Vallejo, E., Lozano, D., & Torrico, F. (2016). Caracterización de la infestación de viviendas por *Aedes aegypti* en el área metropolitana de Cochabamba, Bolivia: nuevos registros altitudinales. (Spanish). *Gaceta Médica Boliviana*, 39(2), 96–99. Retrieved from http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S1012-29662016000200005&script=sci_arttext
- Arredondo-Jiménez, J. I., & Valdez-Delgado, K. M. (2006). *Aedes aegypti* pupal/demographic surveys in southern Mexico: consistency and practicality. Retrieved from <http://www.maneyonline.com/doi/abs/10.1179/136485906X105480>
- Borgherini, G., Poubeau, P., Jossaume, A., Goux, A., Cotte, L., Michault, A., ... Paganin, F. (2008). Persistent arthralgia associated with chikungunya virus: a study of 88 adult patients on reunion island. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 47(4), 469–75. <https://doi.org/10.1086/590003>
- Borgherini, G., Poubeau, P., Staikowsky, F., Lory, M., Le Moullec, N., Becquart, J. P., ... Paganin, F. (2007). Outbreak of chikungunya on Reunion Island: early clinical and laboratory features in 157 adult patients. *Clinical Infectious Diseases*, 44, 1401–1407. <https://doi.org/10.1086/517537>
- Brighton, S. W., Prozesky, O. W., & de la Harpe, A. L. (1983). Chikungunya virus infection. A retrospective study of 107 cases. *South African Medical Journal*, 63(9), 313–315.
- Caglioti, C., Lalle, E., Castilletti, C., Carletti, F., Capobianchi, M. R., & Bordi, L. (2013). Chikungunya virus infection: an overview. *The New Microbiologica*, 36(3), 211–27. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23912863>
- Casas-Martínez, M., & Torres-Estrada, J. L. (2003). First evidence of *Aedes albopictus* (Skuse) in southern Chiapas, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 9(5), 606–7. Retrieved from

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2972768&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- CENAPRECE. (2014). Declaratoria de Emergencia Epidemiológica EE-2-2014 para el estado de Chiapas ante el primer caso de transmisión autóctona de enfermedad por virus de Chikungunya. Retrieved April 17, 2015, from http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/emergencias/descargas/pdf/Declaratoria_Emergencia_Chiapas_Chikungunya.pdf
- Chaves, T. do S. S., Pellini, A. C. G., Mascheretti, M., Jahnel, M. T., Ribeiro, A. F., Rodrigues, S. G., ... Boulos, M. (2012). Travelers as sentinels for chikungunya fever, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, *18*(3), 529–30. <https://doi.org/10.3201/eid1803.110838>
- Christophers, S. (1960). *Aedes aegypti (L.) the yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure*. London, England: Cambridge University Press. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19602901825>
- Clark, G. G., Seda, H., & Gubler, D. J. (1994). Use of the “CDC backpack aspirator” for surveillance of *Aedes aegypti* in San Juan, Puerto Rico. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, *10*, 119–124.
- Clements, A. N. (1992). The biology of mosquitoes. *The Biology of Mosquitoes*, *2*, 1–509. Retrieved from https://books.google.com.mx/books/about/The_Biology_of_Mosquitoes_Development_nu.html?id=8cGRnQEACAAJ&redir_esc=y
- CONEVAL. (2015). Suchiate, Chiapas. Retrieved from https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/33312/Chiapas_087.pdf
- CONEVAL. (2017). Suchiate, Chiapas. Retrieved from http://diariooficial.gob.mx/SEDESOL/2017/Chiapas_087.pdf
- Dantés, H. G., Farfán-Ale, J. A., & Sarti, E. (2014). Epidemiological trends of dengue disease in Mexico (2000-2011): a systematic literature search and analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *8*(11), e3158. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003158>
- Delatte, H., Paupy, C., Dehecq, J. S., Thiria, J., Failloux, A. B., & Fontenille, D. (2008). *Aedes albopictus*, vecteur des virus du chikungunya et de la dengue à la Réunion : biologie et contrôle. *Parasite*, *15*(1), 3–13. <https://doi.org/10.1051/parasite/2008151003>
- Diallo, M., Thonnon, J., Traore-Lamizana, M., & Fontenille, D. (1999). Vectors of Chikungunya virus in Senegal: Current data and transmission cycles. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *60*(2), 281–286. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.281>
- Díaz-Quinonez, J. A., Ortiz-Alcántara, J., Fragoso-Fonseca, D. E., Garcés-Ayala, F., Escobar-Escamilla, N.,

- Vázquez-Pichardo, M., ... Ramírez-González, J. E. (2015). Complete genome sequences of chikungunya virus strains isolated in Mexico: first detection of imported and autochthonous cases. *Genome Announcements*, 3(3), e00300-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00300-15>
- Dirección General de Epidemiología. (2015). Boletín Epidemiológico semana 53 2014. Retrieved from <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2014/sem53.pdf>
- Dirección General de Epidemiología. (2016). Boletín Epidemiológico semana 52 2015, 32(52). Retrieved from <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/50233/sem52.pdf>
- Dupont-Rouzeyrol, M., Caro, V., Guillaumot, L., Vazeille, M., D'Ortenzio, E., Thiberge, J.-M., ... Failloux, A.-B. (2012). Chikungunya virus and the mosquito vector *Aedes aegypti* in New Caledonia (South Pacific Region). *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 12(12), 1036–41. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0937>
- Economopoulou, A., Dominguez, M., Helynck, B., Sissoko, D., Wichmann, O., Quenel, P., ... Quatresous, I. (2009). Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Réunion. *Epidemiology and Infection*, 137(4), 534–41. <https://doi.org/10.1017/S0950268808001167>
- Ede, L. C., O'Brien, J., Chonmaitree, T., Han, Y., & Patel, J. A. (2013). Lactate dehydrogenase as a marker of nasopharyngeal inflammatory injury during viral upper respiratory infection: implications for acute otitis media. *Pediatric Research*, 73(3), 349–54. <https://doi.org/10.1038/pr.2012.179>
- Erasmus, J. H., Needham, J., Raychaudhuri, S., Diamond, M. S., Beasley, D. W. C., Morkowski, S., ... Weaver, S. C. (2015). Utilization of an Eilat Virus-Based Chimera for Serological Detection of Chikungunya Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(10), e0004119. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004119>
- Fernández-Salas, I. (2009). *Biología y control de Aedes aegypti. Manual de operaciones*. (Editorial UANL, Ed.) (2 Edición). Monterrey, Nuevo León.
- Fisher, M., & Staples, J. E. (2014). Chikungunya Virus Spreads in the Americas — Caribbean and South America, 2013–2014. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 63(22), 500–5001. Retrieved from <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6322a5.htm>
- Fourie, E. D., & Morrison, J. G. (1979). Rheumatoid arthritic syndrome after chikungunya fever. *South African Medical Journal*, 56(4), 130–132.
- García-Rejón, J. (2016). Del virus Mayaro y su probable entrada a México y su impacto en la Península Yucatán. *Ciencia Y Humanismo En La Salud*, 3(3), 1–3. Retrieved from <http://revista.medicina.uady.mx/revista/index.php/cienciayhumanismo/article/view/72>

- Garcia-Rejon, J., Loroño-Pino, M. A., Farfan-Ale, J. A., Flores-Flores, L., Del Pilar Rosado-Paredes, E., Rivero-Cardenas, N., ... Eisen, L. (2008). Dengue virus-infected *Aedes aegypti* in the home environment. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 79(6), 940–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19052309>
- Garmashova, N., Gorchakov, R., Volkova, E., Paessler, S., Frolova, E., & Frolov, I. (2007). The Old World and New World alphaviruses use different virus-specific proteins for induction of transcriptional shutoff. *Journal of Virology*, 81(5), 2472–84. <https://doi.org/10.1128/JVI.02073-06>
- Gérardin, P., Guernier, V., Perrau, J., Fianu, A., Le Roux, K., Grivard, P., ... Favier, F. (2008). Estimating Chikungunya prevalence in La Réunion Island outbreak by serosurveys: two methods for two critical times of the epidemic. *BMC Infectious Diseases*, 8(1), 99. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-8-99>
- Gibney, K. B., Fischer, M., Prince, H. E., Kramer, L. D., St George, K., Kosoy, O. L., ... Staples, J. E. (2011). Chikungunya fever in the United States: a fifteen year review of cases. *Clinical Infectious Diseases*, 52(5), e121-6. <https://doi.org/10.1093/cid/ciq214>
- Griffin, D. E. (2007). Alphavirus. In D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.), *Fields Virology* (pp. 1023–1068). Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins.
- Guedes, D. R. D., Cordeiro, M. T., Melo-Santos, M. A. V., Magalhaes, T., Marques, E., Regis, L., ... Ayres, C. F. J. (2010). Patient-based dengue virus surveillance in *Aedes aegypti* from Recife, Brazil. *Journal Of Vector Borne Diseases*, 47(2), 67–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20539043>
- Guerbois, M., Fernandez-Salas, I., Azar, S. R., Danis-Lozano, R., Alpuche-Aranda, C. M., Leal, G., ... Weaver, S. C. (2016). Outbreak of Zika Virus Infection, Chiapas State, Mexico, 2015, and First Confirmed Transmission by *Aedes aegypti* Mosquitoes in the Americas. *Journal of Infectious Diseases*, 214(9), 1349–1356. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw302>
- Halstead, S. B., Scanlon, J. E., Umpaivit, P., & Udomsakdi, S. (1969). Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962–1964 IV. Epidemiologic studies in the Bangkok metropolitan area. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 18(6), 997–1021.
- Hernández-Ávila, J. E., Rodríguez, M.-H., Santos-Luna, R., Sánchez-Castañeda, V., Román-Pérez, S., Ríos-Salgado, V. H., & Salas-Sarmiento, J. A. (2013). Nation-wide, web-based, geographic information system for the integrated surveillance and control of dengue fever in Mexico. *PloS One*, 8(8), e70231. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070231>
- Hertz, J. T., Saganda, W., Munishi, O. M., Crump, J. A., Howe, S., Kinabo, G. D., ... Onyango, J. J. (2012). Chikungunya and Dengue Fever among Hospitalized Febrile Patients in Northern Tanzania. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(1), 171–177.

<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0393>

- Hochedez, P., Jaureguiberry, S., Debruyne, M., Bossi, P., Hausfater, P., Brucker, G., ... Caumes, E. (2006). Chikungunya infection in travelers. *Emerging Infectious Diseases*, 12(10), 1565–7. <https://doi.org/10.3201/eid1210.060495>
- Honório, N. A., Nogueira, R. M. R., Codeço, C. T., Carvalho, M. S., Cruz, O. G., De Avelar Figueiredo Mafra Magalhães, M., ... Lourenço-de-Oliveira, R. (2009). Spatial Evaluation and Modeling of Dengue Seroprevalence and Vector Density in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(11), 11. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2768822&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Horstick, O., Runge-Ranzinger, S., Nathan, M. B., & Kroeger, A. (2010). Dengue vector-control services: how do they work? A systematic literature review and country case studies. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 104(6), 379–86. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.07.027>
- INAFED. (2010). Suchiate. Retrieved from <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM07chiapas/municipios/07087a.html>
- Johnson, B. W., Russell, B. J., & Goodman, C. H. (2016). Laboratory Diagnosis of Chikungunya Virus Infections and Commercial Sources for Diagnostic Assays. *Journal of Infectious Diseases*, 214(suppl 5), S471–S474. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw274>
- Jupp, P. G., & McIntosh, B. M. (1990). *Aedes furcifer* and other mosquitoes as vectors of chikungunya virus at Mica, northeastern Transvaal, South Africa. *J Am Mosq Control Assoc*, 6(3), 415–420.
- Kelvin, A. A. (2011). Outbreak of Chikungunya in the Republic of Congo and the global picture. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 5(6), 441–444. <https://doi.org/10.3855/jidc.2171>
- Kennedy, A. C., Fleming, J., & Solomon, L. (1980). Chikungunya viral arthropathy: a clinical description. *The Journal of Rheumatology*, 7(2), 231–236.
- Keny, M. S., Pereira, I. A., Desa, S. B., & Gomes, E. J. (2014). Painful cervical lymphadenopathy: An unusual presentation of chikungunya. *International Journal of Applied & Basic Medical Research*, 4(1), 47–9. <https://doi.org/10.4103/2229-516X.125695>
- Kettle, D. S. (1995). *Medical and veterinary entomology* (Vol. 725). CAB international Wallingford.
- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., & Lefkowitz, E. J. (2012). Togaviridae. In *Virus Taxonomy* (pp. 1103–1110). Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123846846000951>

- Kiwanuka, N., Sanders, E. J., Rwaguma, E. B., Kawamata, J., Ssengooba, F. P., Najjemba, R., ... Campbell, G. L. (1999). O'nyong-nyong fever in south-central Uganda, 1996-1997: clinical features and validation of a clinical case definition for surveillance purposes. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 29(5), 1243–50.
<https://doi.org/10.1086/313462>
- Kraemer, M. U. G., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A., Shearer, F. M., Barker, C. M., ... Hay, S. I. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *eLife*, 4, e08347.
<https://doi.org/10.7554/eLife.08347>
- Kuri-Morales, P., Correa-Morales, F., González-Acosta, C., Sánchez-Tejeda, G., Dávalos-Becerril, E., Fernanda Juárez-Franco, M., ... González-Roldán, J. F. (2017). First report of *Stegomyia aegypti* (= *Aedes aegypti*) in Mexico City, Mexico. *Medical and Veterinary Entomology*, 31(2), 240–242.
<https://doi.org/10.1111/mve.12225>
- Lakshmi, V., Neeraja, M., Subbalaxmi, M. V. S., Parida, M. M., Dash, P. K., Santhosh, S. R., & Rao, P. V. L. (2008). Clinical features and molecular diagnosis of Chikungunya fever from South India. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46(9), 1436–42. <https://doi.org/10.1086/529444>
- Lam, S. K., Chua, K. B., Hooi, P. S., Rahimah, M. A., Kumari, S., Tharmaratnam, M., ... Sampson, I. A. (2001). Chikungunya infection--an emerging disease in Malaysia. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 32(2), 447–451.
- Lambrechts, L., Paaijmans, K. P., Fansiri, T., Carrington, L. B., Kramer, L. D., Thomas, M. B., & Scott, T. W. (2011). Impact of daily temperature fluctuations on dengue virus transmission by *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(18), 7460–5.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1101377108>
- Lanciotti, R. S., & Valadere, A. M. (2014). Transcontinental movement of Asian genotype chikungunya virus. *Emerging Infectious Diseases*, 20(8), 1400–2. <https://doi.org/10.3201/eid2008.140268>
- Laoprasopwattana, K., Kaewjungwad, L., Jarumanokul, R., & Geater, A. (2012). Differential diagnosis of Chikungunya, dengue viral infection and other acute febrile illnesses in children. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 31(5), 459–463.
- Ledrans, M., Quatresous, I., Renault, P., & Pierre, V. (2007). Outbreak of chikungunya in the French Territories, 2006: lessons learned. *Eurosurveillance*, 12(36). Retrieved from <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3262>
- Lee, V. J., Chow, A., Zheng, X., Carrasco, L. R., Cook, A. R., Lye, D. C., ... Leo, Y.-S. (2012). Simple clinical and laboratory predictors of Chikungunya versus dengue infections in adults. *PLoS Neglected*

Tropical Diseases, 6(9), e1786. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001786>

- Lees, R. S., Gilles, J. R., Hendrichs, J., Vreysen, M. J., & Bourtzis, K. (2015). Back to the future: the sterile insect technique against mosquito disease vectors. *Current Opinion in Insect Science*, 10, 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.05.011>
- Leroy, E. M., Nkoghe, D., Ollomo, B., Nze-Nkogue, C., Becquart, P., Grard, G., ... De Lamballerie, X. (2009). Concurrent chikungunya and dengue virus infections during simultaneous outbreaks, Gabon, 2007. *Emerging Infectious Diseases*, 15(4), 591–593. <https://doi.org/10.3201/eid1504.080664>
- Lindsey, N. P., Prince, H. E., Kosoy, O., Laven, J., Messenger, S., Staples, J. E., & Fischer, M. (2015). Chikungunya virus infections among travelers—United States, 2010–2013. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 92(1), 82–7. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0442>
- Macpherson, C., Noël, T., Fields, P., Jungkind, D., Yearwood, K., Simmons, M., ... LaBeaud, A. D. (2016). Clinical and serological insights from the asian lineage Chikungunya outbreak in Grenada, 2014: An observational study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(4), 890–893. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0122>
- Mahendradas, P., Ranganna, S. K., Shetty, R., Balu, R., Narayana, K. M., Babu, R. B., & Shetty, B. K. (2008). Ocular manifestations associated with chikungunya. *Ophthalmology*, 115(2), 287–291. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2007.03.085>
- Mattar, S., Miranda, J., Pinzon, H., Tique, V., Bolanos, A., Aponte, J., ... Aleman, A. (2015). Outbreak of Chikungunya virus in the north Caribbean area of Colombia: clinical presentation and phylogenetic analysis. *Journal of Infection in Developing Countries*, 9(10), 1126–32. <https://doi.org/10.3855/jidc.6670>
- Mavalankar, D., Shastri, P., Bandyopadhyay, T., Parmar, J., & Ramani, K. V. (2008). Increased mortality rate associated with chikungunya epidemic, Ahmedabad, India. *Emerging Infectious Diseases*, 14(3), 412–5. <https://doi.org/10.3201/eid1403.070720>
- McCrae, A. W. R., Henderson, B. E., Kirya, B. G., & Sempala, S. D. K. (1971). Chikungunya virus in the Entebbé area of Uganda: Isolations and epidemiology. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 65(2), 152–168. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(71\)90212-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(71)90212-4)
- Moreira, L. A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J. A., Lu, G., Pyke, A. T., Hedges, L. M., ... O'Neill, S. L. (2009). A Wolbachia symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*, 139(7), 1268–78. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.042>
- Muyembe-Tamfum, J. J., Peyrefitte, C. N., Yogo, R., Mathina Basisya, E., Koyange, D., Pukuta, E., ... Durand, J. P. (2003). [Epidemic of Chikungunya virus in 1999 and 2000 in the Democratic Republic of the Congo]. *Médecine Tropicale : Revue Du Corps de Santé Colonial*, 63(6), 637–8. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15077435>

- Myers, R. M., Carey, D. E., Reuben, R., Jesudass, E. S., De Ranitz, C., & Jadhav, M. (1965). The 1964 epidemic of dengue-like fever in South India: isolation of chikungunya virus from human sera and from mosquitoes. *The Indian Journal of Medical Research*, 53(8), 694–701. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5830403>
- Narro Robles, J., & Gómez Dantés, H. (1995, January 3). El dengue en México: un problema de salud publica. *Salud Publica Mex.* [Secretaría de Salubridad y Asistencia]. Retrieved from <http://www.saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/4560>
- Nelson, J. M. (1983). *Aedes aegypti*: biología y ecología. *Organizacion Panamericana de La Salud. Washington, DC*, 86. Retrieved from <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/28513>
- Nkoghe, D., Kassa, R. F., Caron, M., Grard, G., Mombo, I., Bikié, B., ... Leroy, E. M. (2012). Clinical forms of chikungunya in Gabon, 2010. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(2), e1517. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001517>
- Norman, F. F., Monge-Maillo, B., Perez-Molina, J.-A., de Ory, F., Franco, L., Sánchez-Seco, M.-P., & López-Vélez, R. (2015). Lymphadenopathy in Patients With Chikungunya Virus Infection Imported From Hispaniola: Case Reports. *Journal of Travel Medicine*, 22(4), 272–275. <https://doi.org/10.1111/jtm.12204>
- Ogren, C. (2007). Migration and human rights on the Mexico-Guatemala border. *International Migration*, 45(4), 203–243. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2435.2007.00424.x>
- Omarjee, R., Prat, C. M., Flusin, O., Boucau, S., Tenebray, B., Merle, O., ... Leparç-Goffart, I. (2014). Importance of case definition to monitor ongoing outbreak of chikungunya virus on a background of actively circulating dengue virus, St Martin, December 2013 to January 2014. *Euro Surveill*, 19, 13.
- PAHO. (2011). Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus chikungunya en las Américas. Washington, D.C: Organización Panamericana de la Salud. Retrieved from http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/CHIKV_Spanish.pdf
- PAHO. (2013). *Epidemiological alert. Chikungunya fever, 9 December 2013*. Retrieved from http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=23806+&Itemid=999999&lang=en
- PAHO. (2014). Número de casos reportados de chikungunya en países o territorios de las Américas 2013-2014 (por semanas) Semana Epidemiológica / SE 44 (actualizada al 31 de octubre del 2014). Retrieved from file:///C:/Users/Esteban/Downloads/2014-oct-31-cha-CHIKV-casos-autoc-import-se-44.pdf
- PAHO. (2015). Número de casos reportados de fiebre chikungunya en las Américas- año 2014. Retrieved

from

http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&Itemid=&gid=30199&lang=es

PAHO. (2016a). Número de casos reportados de fiebre chikungunya en las Américas - 2015. Retrieved from http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&Itemid=270&gid=33092&lang=es

PAHO. (2016b). Países/Territorios con transmisión autóctona o casos importados de Chikungunya en las Américas, 2015. Retrieved from http://www.paho.org/hq/images/stories/AD/HSD/IR/Viral_Diseases/Chikungunya/CHIKV-Datos-Caribe-2015-SE-52.jpg?ua=1

PAHO. (2017). Chikungunya: Statistic Data. Retrieved from http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=5927&Itemid=40931&lang=en

Paquet, C., Quatresous, I., Solet, J. L., Sissoko, D., Renault, P., Pierre, V., ... Schuffnecker, I. (2006). Chikungunya outbreak in Reunion: epidemiology and surveillance, 2005 to early January 2006. *Euro Surveillance : Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin.*, 11(2), 2891. <https://doi.org/1891> [pii]

Paredes, A. M., Brown, D. T., Rothnagel, R., Chiu, W., Schoepp, R. J., Johnston, R. E., & Prasad, B. V. (1993). Three-dimensional structure of a membrane-containing virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(19), 9095–9099. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.19.9095>

Parola, P., de Lamballerie, X., Jourdan, J., Rovey, C., Vaillant, V., Minodier, P., ... Charrel, R. N. (2006). Novel chikungunya virus variant in travelers returning from Indian Ocean islands. *Emerging Infectious Diseases*, 12(10), 1493–9. <https://doi.org/10.3201/eid1210.060610>

Paupy, C., Ollomo, B., Kamgang, B., Moutailler, S., Rousset, D., Demanou, M., ... Simard, F. (2010). Comparative Role of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in the Emergence of Dengue and Chikungunya in Central Africa. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(3), 259–266. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0005>

Phuc, H. K., Andreasen, M. H., Burton, R. S., Vass, C., Epton, M. J., Pape, G., ... Alphey, L. (2007). Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. *BMC Biology*, 5(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-5-11>

Powers, A. M., & Logue, C. H. (2007). Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *The Journal of General Virology*, 88(Pt 9), 2363–77. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82858-0>

Powers, A. M., & Roehrig, J. T. (2010). Alphaviruses. *Diagnostic Virology Protocols*, 665, 17–38. Retrieved

from http://www.springerprotocols.com/Abstract/doi/10.1007/978-1-60761-817-1_2

Quatresous, I. (2006). E-alert 27 January: Chikungunya outbreak in Reunion, a French overseas department. *Euro Surveillance : Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*. Department International et Tropical, Institut de Veille Sanitaire, France.

i.quatresous@invs.sante.fr. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/16804201>

Queyriaux, B., Simon, F., Grandadam, M., Michel, R., Tolou, H., & Boutin, J.-P. (2008). Clinical burden of chikungunya virus infection. *The Lancet. Infectious Diseases*, 8(1), 2–3. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70294-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70294-3)

Reiter, P., Amador, M. A., Anderson, R. A., & Clark, G. G. (1995). Short report: dispersal of *Aedes aegypti* in an urban area after blood feeding as demonstrated by rubidium-marked eggs. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*, 52(2), 177–179. Retrieved from <http://www.ajtmh.org/cgi/content/abstract/52/2/177>

Reiter, P., Fontenille, D., & Paupy, C. (2006). *Aedes albopictus* as an epidemic vector of chikungunya virus: another emerging problem? *Lancet Infectious Diseases*, 6(8), 463–464. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70531-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70531-X)

Reller, M. E., Akoroda, U., Nagahawatte, A., Devasiri, V., Kodikaarachchi, W., Strouse, J. J., ... Bodinayake, C. (2013). Chikungunya as a cause of acute febrile illness in southern Sri Lanka. *PLoS One*, 8(12), e82259. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082259>

Rezza, G., Nicoletti, L., Angelini, R., Romi, R., Finarelli, A. C., Panning, M., ... Cassone, A. (2007). Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet*, 370(9602), 1840–6. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61779-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61779-6)

Rianthavorn, P., Prianantathavorn, K., Wuttirattanakowit, N., Theamboonlers, A., & Poovorawan, Y. (2010). An outbreak of chikungunya in southern Thailand from 2008 to 2009 caused by African strains with A226V mutation. *International Journal of Infectious Diseases : IJID : Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 14 Suppl 3, e161-5. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.01.001>

Rivera-Ávila, R. C. (2014). Fiebre chikungunya en México: caso confirmado y apuntes para la respuesta epidemiológica. *Salud Publica de Mexico*, 56(4), 402–404.

Robinson, M. C. (1955). An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 49(1), 28–32. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(55\)90080-8](https://doi.org/10.1016/0035-9203(55)90080-8)

Ross, R. W. (1956). The Newala Epidemic III. The virus: Isolation, Pathogenic properties and relationship to the epidemic. *The Newala Epidemic*, 54(2), 177–191. <https://doi.org/10.1017/S0022172400044442>.

- Roth, A., Hoy, D., Horwood, P. F., Ropa, B., Hancock, T., Guillaumot, L., ... Soares, Y. (2014). Preparedness for threat of chikungunya in the pacific. *Emerging Infectious Diseases*, 20(8). <https://doi.org/10.3201/eid2008.130696>
- Rudnick, A., & Hammon, W. M. (1962). Entomological aspects of Thai hemorrhagic fever epidemics in Bangkok, the Phillipines and Singapore, 1956–1961. *SEATO Med Res Monograph*, 2, 24–29.
- Sahadeo, N., Mohammed, H., Allicock, O. M., Auguste, A. J., Widen, S. G., Badal, K., ... Carrington, C. V. F. (2015). Molecular Characterisation of Chikungunya Virus Infections in Trinidad and Comparison of Clinical and Laboratory Features with Dengue and Other Acute Febrile Cases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(11), e0004199. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004199>
- Salomón-Grajales, J., Lugo-Moguel, G. V., Tinal-Gordillo, V. R., de La Cruz-Velázquez, J., Beaty, B. J., Eisen, L., ... García-Rejón, J. E. (2012). *Aedes albopictus* mosquitoes, Yucatan Peninsula, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 18(3), 525–7. <https://doi.org/10.3201/eid1803.111626>
- Salonen, A., Ahola, T., & Kääriäinen, L. (2005). Viral RNA replication in association with cellular membranes. In *Membrane trafficking in viral replication* (pp. 139–173). Springer.
- Sang, R. C., Ahmed, O., Faye, O., Kelly, C. L. H., Yahaya, A. A., Mmadi, I., ... Powers, A. M. (2008). Entomologic Investigations of a Chikungunya Virus Epidemic in the Union of the Comoros, 2005. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*, 78(1), 77–82. Retrieved from <http://www.ajtmh.org/content/78/1/77.short>
- Sarkar, J. K. (1966). Virological studies of haemorrhagic fever in Calcutta. *Bulletin of the World Health Organization*, 35(1), 59. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19691000024>
- Savage, H. M., Ledermann, J. P., Yug, L., Burkhalter, K. L., Marfel, M., & Hancock, W. T. (2015). Incrimination of *Aedes (Stegomyia) hensilli* Farner as an epidemic vector of Chikungunya virus on Yap Island, Federated States of Micronesia, 2013. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*, 92(2), 429–36. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0374>
- Saxena, S. K., Singh, M., Mishra, N., & Lakshmi, V. (2006). Resurgence of chikungunya virus in India: an emerging threat. *Eurosurveillance*, 11(8), E060810.
- Schlesinger, M., & Schlesinger, S. (1986). Formation and Assembly of Alphavirus Glycoproteins. In S. Schlesinger & M. Schlesinger (Eds.), *The Togaviridae and Flaviviridae* (pp. 121–148). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0785-4_5
- Schwartz, O., & Albert, M. L. (2010). Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(7), 491–500. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2368>
- Secretaría de Hacienda del Estado de Chiapas. (2012). Programa Regional de Desarrollo Region X

- Soconusco. Retrieved from <http://www.haciendachiapas.gob.mx/planeacion/Informacion/Desarrollo-Regional/prog-regionales/SOCONUSCO.pdf>
- Sergon, K., Njuguna, C., Kalani, R., Ofula, V., Onyango, C., Konongoi, L. S., ... Breiman, R. F. (2008). Seroprevalence of Chikungunya Virus (CHIKV) Infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. *Am J Trop Med Hyg*, 78(2), 333–337. Retrieved from <http://www.ajtmh.org/content/78/2/333.short>
- Sergon, K., Yahaya, A. A., Brown, J., Bedja, S. A., Mlindasse, M., Agata, N., ... Breiman, R. F. (2007). Seroprevalence of Chikungunya virus infection on Grande Comore Island, union of the Comoros, 2005. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*, 76(6), 1189–1193. Retrieved from <http://www.ajtmh.org/cgi/content/long/76/6/1189>
- Sharda, M., & Meena, H. (2007). Neurological complications in Chikungunya fever. *The Journal of the Association of Physicians of India*, 55, 765–769.
- Simizu, B., Yamamoto, K., Hashimoto, K., & Ogata, T. (1984). Structural proteins of Chikungunya virus. *J. Virol.*, 51(1), 254–258. Retrieved from <http://jvi.asm.org/content/51/1/254.short>
- Singapore MOH. (2013). *Weekly Infectious Disease Bulletin. Week 53*. Retrieved from https://www.moh.gov.sg/content/dam/moh_web/Statistics/Infectious_Diseases_Bulletin/2013/December/2013_week_52.pdf.
- Singh, S. S., Manimunda, S. P., Sugunan, A. P., Sahina, & Vijayachari, P. (2008). Four cases of acute flaccid paralysis associated with chikungunya virus infection. *Epidemiology and Infection*, 136(9), 1277–80. <https://doi.org/10.1017/S0950268807009739>
- Sissoko, D., Ezzedine, K., Moendandzé, A., Giry, C., Renault, P., & Malvy, D. (2010). Field evaluation of clinical features during chikungunya outbreak in Mayotte, 2005-2006. *Tropical Medicine & International Health : TM & IH*, 15(5), 600–7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2010.02485.x>
- Sissoko, D., Moendandze, A., Malvy, D., Giry, C., Ezzedine, K., Solet, J. L., & Pierre, V. (2008). Seroprevalence and risk factors of chikungunya virus infection in Mayotte, Indian Ocean, 2005-2006: a population-based survey. *PloS One*, 3(8), e3066. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003066>
- Sistema Nacional de Información Municipal. (2010). Bases de datos. Salud. Retrieved from <http://www.snim.rami.gob.mx/>
- Soumahoro, M. K., Fontenille, D., Turbelin, C., Pelat, C., Boyd, A., Flahault, A., & Hanslik, T. (2010). Imported chikungunya virus infection. *Emerging Infectious Diseases*, 16(1), 162–3. <https://doi.org/10.3201/eid1601.080776>
- Staikowsky, F., Talarmin, F., Grivard, P., Souab, A., Schuffenecker, I., Le Roux, K., ... Michault, A. (2009). Prospective study of Chikungunya virus acute infection in the Island of La Réunion during the 2005-

2006 outbreak. *PLoS One*, 4(10), e7603. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007603>

- Taraphdar, D., Sarkar, A., Mukhopadhyay, B. B., & Chatterjee, S. (2012). A comparative study of clinical features between monotypic and dual infection cases with Chikungunya virus and dengue virus in West Bengal, India. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(4), 720–3. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0704>
- Teixeira-Nunes, M. R., Faria, N. R., de Vasconcelos, J. M., Golding, N., Kraemer, M. U., de Oliveira, L. F., ... da Costa Vasconcelos, P. F. (2015). Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Medicine*, 13(1), 102. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0348-x>
- Teixeira, L., Ferreira, A., & Ashburner, M. (2008). The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biology*, 6(12), e2. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000002>
- Teo, T.-H., Her, Z., Tan, J. J. L., Lum, F.-M., Lee, W. W. L., Chan, Y.-H., ... Ng, L. F. P. (2015). Caribbean and La Réunion Chikungunya Virus Isolates Differ in Their Capacity To Induce Proinflammatory Th1 and NK Cell Responses and Acute Joint Pathology. *Journal of Virology*, 89(15), 7955–69. <https://doi.org/10.1128/JVI.00909-15>
- Thavara, U., Tawatsin, A., Pengsakul, T., Bhakdeenuan, P., Chanama, S., Anantapreecha, S., ... Siritiyasatien, P. (2009). Outbreak of chikungunya fever in Thailand and virus detection in field population of vector mosquitoes, *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 40(5), 951–962. Retrieved from <https://search.proquest.com/openview/4e69c9c8a35d6f985ac494fe0c55782e/1?pq-origsite=gscholar&cbl=34824>
- Thiberville, S. D., Boisson, V., Gaudart, J., Simon, F., Flahault, A., & de Lamballerie, X. (2013). Chikungunya fever: a clinical and virological investigation of outpatients on Reunion Island, South-West Indian Ocean. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(1), e2004. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002004>
- Thiberville, S. D., Moyen, N., Dupuis-Maguiraga, L., Nougairede, A., Gould, E. A., Roques, P., & de Lamballerie, X. (2013, September 1). Chikungunya fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. *Antiviral Research*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.06.009>
- Tsetsarkin, K. A., Chen, R., Sherman, M. B., & Weaver, S. C. (2011). Chikungunya virus: evolution and genetic determinants of emergence. *Current Opinion in Virology*, 1(4), 310–7. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.07.004>
- Tsetsarkin, K. A., Chen, R., Yun, R., Rossi, S. L., Plante, K. S., Guerbois, M., ... Weaver, S. C. (2014). Multi-peaked adaptive landscape for chikungunya virus evolution predicts continued fitness

- optimization in *Aedes albopictus* mosquitoes. *Nature Communications*, 5, 4084.
<https://doi.org/10.1038/ncomms5084>
- Tsetsarkin, K. A., Vanlandingham, D. L., McGee, C. E., & Higgs, S. (2007). A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathogens*, 3(12), e201.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030201>
- Urdaneta-Marquez, L., & Failloux, A.-B. (2011). Population genetic structure of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue viruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(2), 253–261. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134810003229>
- Vazeille, M., Moutailler, S., Coudrier, D., Rousseaux, C., Khun, H., Huerre, M., ... Failloux, A.-B. (2007). Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. *PloS One*, 2(11), e1168.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001168>
- Vega-Rúa, A., Zouache, K., Girod, R., Failloux, A.-B., & Lourenço-de-Oliveira, R. (2014). High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. *Journal of Virology*, 88(11), 6294–306.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00370-14>
- Velázquez, E. H. (2010). Reformulaciones locales de la ciudadanía agraria en una región indígena del Istmo veracruzano. *LiminaR*, 8(1), 13–30. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1665-80272010000100002&script=sci_arttext
- Vijayakumar, K. P., Nair Anish, T. S., George, B., Lawrence, T., Muthukkutty, S. C., & Ramachandran, R. (2011). Clinical Profile of Chikungunya Patients during the Epidemic of 2007 in Kerala, India. *Journal of Global Infectious Diseases*, 3(3), 221–6. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.83526>
- Villegas-Trejo, A., Manrique-Saide, P., Che-Mendoza, A., Cruz-Canto, W., Fernández, M. G., González-Acosta, C., ... Arredondo-Jiménez, J. I. (2010). First Report of *Aedes albopictus* and Other Mosquito Species in Morelos, Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 26(3), 321–323.
<https://doi.org/10.2987/10-6014.1>
- Volk, S. M., Chen, R., Tsetsarkin, K. A., Adams, A. P., Garcia, T. I., Sall, A. A., ... Weaver, S. C. (2010). Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. *Journal of Virology*, 84(13), 6497–504.
<https://doi.org/10.1128/JVI.01603-09>
- Voss, J. E., Vaney, M.-C., Duquerroy, S., Vonnrhein, C., Girard-Blanc, C., Crublet, E., ... Rey, F. A. (2010). Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature*, 468(7324), 709–12. <https://doi.org/10.1038/nature09555>

- Weaver, S. C., Frey, T. K., Huang, H. V., Kinney, R. M., Rice, C. M., Roehrig, J. T., Shope, R. E. Strauss, E. G. (2005). Togaviridae. In C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, & L. A. Ball. (Eds.), *Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (pp. 999–1008). Elsevier Academic Press.
- Weaver, S. C. (2014). Arrival of chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(6), e2921.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002921>
- Weaver, S. C., & Forrester, N. L. (2015). Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. *Antiviral Research*, 120, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.04.016>
- Weaver, S. C., & Lecuit, M. (2015). Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. *New England Journal of Medicine*, 372(13), 1231–1239.
- WHO. (2009). *Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Prevention and Control* (Vol. 409). TDR. <https://doi.org/WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1>
- Wielanek, A. C., Monredon, J. De, Amrani, M. El, Roger, J. C., & Serveaux, J. P. (2007). Guillain-Barré syndrome complicating a Chikungunya virus infection. *Neurology*, 69(22), 2105–7.
<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000277267.07220.88>
- Win, M. K., Chow, A., Dimatatac, F., Go, C. J., & Leo, Y. S. (2010). Chikungunya fever in Singapore: acute clinical and laboratory features, and factors associated with persistent arthralgia. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 49(2), 111–4.
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.07.004>
- World Health Organization. (2008). Guidelines on clinical management of chikungunya fever. *Regional Office for South-East Asia*. Retrieved from
http://www.wpro.who.int/mvp/topics/ntd/Clinical_Mgmt_Chikungunya_WHO_SEARO.pdf
- Wu, D., Wu, J., Zhang, Q., Zhong, H., Ke, C., Deng, X., ... Zhou, H. (2012). Chikungunya outbreak in Guangdong province, China, 2010. *Emerging Infectious Disease Journal*, 18(3), 493–495.
- Zayed, A., Awash, A. A., Esmail, M. A., Al-Mohamadi, H. A., Al-Salwai, M., Al-Jasari, A., ... Mnzava, A. (2012). Detection of Chikungunya virus in *Aedes aegypti* during 2011 outbreak in Al Hodayda, Yemen. *Acta Tropica*, 123(1), 62–6. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.03.004>

ANEXOS

ANEXO 1. DICTÁMEN DEL COMITÉ DE BIOÉTICA DEL INSP



Cuernavaca, Mor., 22 de septiembre, 2015
CI: 1312, No. 1738

Ildfonso Fernández Salas
Investigador Principal
Presente

En relación a su proyecto titulado " *Emergencia del virus de Chikungunya (CHIKV): Tendencias en patrones epidemiológicos, incriminación de vectores, y filogenia de variantes genéticas en Chiapas, México*" me complace informarle que los miembros del Comité de Ética le han otorgado el dictamen de:

Aprobado

Le informamos que esta aprobación tiene vigencia hasta el 21 de septiembre del 2016.

Renovación anual: Si su estudio se extiende por un periodo mayor, favor de presentar el formato de *Renovación anual* con 45 días de anticipación a su fecha de vencimiento. Favor de solicitar vía electrónica el formato correspondiente a este Comité. Nota: Es responsabilidad de usted como Investigador/a Responsable de este proyecto solicitar la renovación anual de su estudio con suficiente anticipación.

Consentimiento: Para obtener el consentimiento de los sujetos humanos de su estudio únicamente se deberán utilizar los materiales que han sido aprobados y sellados por este Comité.

Addenda/Modificaciones: Le recuerdo que cualquier cambio o actualización en los procedimientos de este estudio deberá ser enviado a este Comité previo a su implementación, utilizando el sistema SIID. El número de su proyecto es **1312** y el de esta aprobación es **1738**. Le pedimos hacer referencia a estos números para cualquier correspondencia futura.

Le agradecemos su cooperación y compromiso con la protección de los derechos de los sujetos humanos en la investigación.

Atentamente

Angélica Ángeles Llerenas
Presidente

Avenida Universidad 655
Cerrada Los Pinos y Caminera
Colonia Santa María Ahuacatitán
62100 Cuernavaca, Morelos, México
conm: (777) 329 3000

www.insp.mx

ANEXO 3. FORMATO DE ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO

SISTEMA NACIONAL DE SALUD
ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE CASO DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTOR

I. DATOS DE IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE Folio _____
 Nombre: _____ No. de afiliación o expediente: _____
 Sexo: M F Fecha de nacimiento: _____
 Estado de nacimiento: _____ Jurisdicción de nacimiento: _____ Municipio de nacimiento: _____
 CURP: _____ Edad: Años Meses Días
 Lugar de residencia: Domicilio _____
 Localidad: _____ Calle y Núm. _____ Colonia o localidad _____ Teléfono (s) _____
 Municipio: _____ Estado: _____
 Lugar laboral: Domicilio _____
 Localidad: _____ Calle y Núm. _____ Colonia o localidad _____ Teléfono (s) _____
 Municipio: _____ Estado: _____

II. DATOS DE LA UNIDAD
 UNIDAD NOTIFICANTE: _____ CLAVE DE LA UNIDAD: _____
 LOCALIDAD: _____ MUNICIPIO: _____ JURISDICCIÓN: _____
 ENTIDAD O DELEGACIÓN: _____ INSTITUCIÓN: _____
 FECHA DE SOLICITUD DE ATENCIÓN: _____ FECHA DE NOTIFICACIÓN: _____ INICIO DE ESTUDIO: _____
 TERMINACIÓN DE ESTUDIO: _____
 FECHA DE PRIMER CONTACTO CON LOS SERVICIOS DE SALUD COMO CASO PROBABLE DE DENGUE HEMORRÁGICO: _____

III. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS
 PROCEDENCIA: Local Foraneo
 HA VISITADO OTROS LUGARES EN LAS ÚLTIMAS DOS SEMANAS: SI NO EN EL ÚLTIMO MES SI NO
 LUGARES VISITADOS: _____
 País: _____
 Localidad: _____ Municipio: _____ Estado: _____
 CONTACTO CON ANIMALES: MOSCO CHINCHE GARRAPATA OTRO _____
 EXISTEN ENFERMOS SIMILARES EN LA LOCALIDAD: _____ HA RECIBIDO TRANSFUSIONES SANGUÍNEAS: SI NO
 ANTECEDENTES DE MUERTES INUSUALES DE ANIMALES: EQUINO AVE OTRO

IV. CUADRO CLÍNICO (Si = 1, No = 2, Ignorados = 9) TEMP _____ °C TEMP _____ °C TEMP _____ °C
 Fecha de inicio de signos y síntomas: _____

Fiebre <input type="checkbox"/>	Fotofobia <input type="checkbox"/>	Alteraciones del gusto <input type="checkbox"/>	Rigidez de cuello <input type="checkbox"/>
Cefalea <input type="checkbox"/>	Dolor abdominal <input type="checkbox"/>	Adenomegalia <input type="checkbox"/>	Estupor <input type="checkbox"/>
Mialgias <input type="checkbox"/>	Diarrea <input type="checkbox"/>	Induración <input type="checkbox"/>	Desorientación <input type="checkbox"/>
Artralgias <input type="checkbox"/>	Conjuntivitis <input type="checkbox"/>	Inflamación de párpado <input type="checkbox"/>	Tembor <input type="checkbox"/>
Dolor retroocular <input type="checkbox"/>	Congestión nasal <input type="checkbox"/>	Disnea <input type="checkbox"/>	Convulsiones <input type="checkbox"/>
Exantema <input type="checkbox"/>	Tos <input type="checkbox"/>	Alteraciones cardiacas <input type="checkbox"/>	Debilidad muscular <input type="checkbox"/>
Prurito <input type="checkbox"/>	Faringitis <input type="checkbox"/>	Nódulos <input type="checkbox"/>	Parálisis <input type="checkbox"/>
Vómito <input type="checkbox"/>	Rinitis <input type="checkbox"/>	Úlceras <input type="checkbox"/>	Otitis <input type="checkbox"/>
Náuseas <input type="checkbox"/>	Hepatomegalia <input type="checkbox"/>	Lesión de membranas mucosas <input type="checkbox"/>	Otras <input type="checkbox"/>
Escalofríos <input type="checkbox"/>	Esplenomegalia <input type="checkbox"/>	Ictericia <input type="checkbox"/>	

 ESCAPE DE LÍQUIDOS HEMORRAGIAS
 Fecha de inicio de signos y síntomas: _____ Fecha de inicio de signos y síntomas: _____

Petequias <input type="checkbox"/>	Gingival <input type="checkbox"/>
Equimosis <input type="checkbox"/>	Epistaxis <input type="checkbox"/>
Hematomas <input type="checkbox"/>	Hematemesis <input type="checkbox"/>
Torniquete positivo <input type="checkbox"/>	Melena <input type="checkbox"/>
Ascitis <input type="checkbox"/>	Otras <input type="checkbox"/>
Derrame pleural <input type="checkbox"/>	

 FUE HOSPITALIZADO: SI NO FECHAS: INGRESO _____ EGRESO _____

FOLIO _____
V. EVOLUCIÓN EN EL HOSPITAL
 ESTABLE GRAVE MEJORA ALTA POR MEJORA ALTA POR DEFUNCIÓN
 En caso de haber datos de escape de líquidos o hemorragias, realizar:
 Fecha: ___/___/___ Hb: _____ % Hb: _____ gr x 100ml Plaquetas: _____ x10³ Albúmina: _____ g/dl
 Fecha: ___/___/___ Hb: _____ % Hb: _____ gr x 100ml Plaquetas: _____ x10³ Albúmina: _____ g/dl
 Fecha: ___/___/___ Hb: _____ % Hb: _____ gr x 100ml Plaquetas: _____ x10³ Albúmina: _____ g/dl
 Fecha: ___/___/___ Hb: _____ % Hb: _____ gr x 100ml Plaquetas: _____ x10³ Albúmina: _____ g/dl
 Fecha: ___/___/___ Hb: _____ % Hb: _____ gr x 100ml Plaquetas: _____ x10³ Albúmina: _____ g/dl
 Fecha: ___/___/___ Hb: _____ % Hb: _____ gr x 100ml Plaquetas: _____ x10³ Albúmina: _____ g/dl
 *Repetirlas de acuerdo a la evolución del enfermo

ESTUDIOS DE GABINETE
 Fecha de ultrasonido: _____ Fecha de radiografía: _____
 Líquido perivisceral y / o en cavidad abdominal Líquido en cavidad torácica

VI. Estudio de laboratorio:
Dengue:
 Fecha toma: _____ ELISA IgM _____ ELISA IgG _____ Aislamiento _____ PCR _____ Otra () _____
 Fecha resultado: _____
 Resultado: + - + - Serotipo Serotipo + -
 Valor de D.O. _____ Titulación _____

Paludismo: Gota Gruesa: _____ Fechas: Toma _____ Resultado: _____ + -
Especie: Paludismo por: Vivax Falciparum

Leishmaniasis: Impronta: _____ Fechas: Toma _____ Resultado: _____ + -
 Serología: _____ Fechas: Toma _____ Resultado: _____ + -

Tripanosomiasis: Dx parasitológico: _____ Fechas: Toma _____ Resultado: _____ + -
 Serología: _____ Fechas: Toma _____ Resultado: _____ + -

Rickettsiosis: Serología: _____ Fechas: Toma _____ Resultado: _____ + -
Titulación: _____

Virus del O. Nilo
 Plasma o Suero Fechas: 1a Toma _____ Resultado: _____ + -
 Suero Fechas: 2 da Toma _____ Resultado: _____ + -
 LCR Fecha de toma _____ Resultado: _____ + -
 Aspecto _____ Células _____ mm3 Leucocitos _____ % Linfocitos _____ %
 P/N _____ % Glucosa _____ mg/dl Proteínas _____ %
 Biopsia Fecha de Toma _____ Resultado: _____ + -

Otros padecimientos (especificar): _____ Fechas: Toma _____ Resultado: _____
 Laboratorio donde se procesó la muestra: _____
 Diagnóstico confirmado por laboratorio: _____

VII. ESTUDIO DE CASOS SIMILARES

NOMBRE	DOMICILIO	EDAD	SEXO		CASO
			M	F	

VIII. OBSERVACIONES

 NOMBRE Y FIRMA DE QUIEN LLENÓ EL FORMATO _____ NOMBRE Y FIRMA DE QUIEN AUTORIZÓ _____

ANEXO 4. EXTRACCIÓN DE ARN CON EL ESTUCHE COMERCIAL ZR-96 (Zymo Research)

Preparación de solución amortiguadora

Antes de comenzar, agregar beta-mercaptoetanol a la solución amortiguadora “Viral RNA” a la solución final de 0.5% (v/v)

Agregar 96 mL de etanol absoluto 100% al concentrado de solución amortiguadora de lavado (R1040)

Protocolo

Todos los pasos de centrifugación deben ser realizados entre 3,000-5000 x g

1. Agregar 3 volúmenes de la solución amortiguadora “Viral RNA” a cada solución de suero o sobrenadante de mosquito y mezclar
2. Transferir cada muestra a la columna Zymo-Spin™ IC dentro del tubo de colección y centrifugar por 1-2 minutos. Descartar sobrenadante
3. Agregar 500 µl de la solución amortiguadora de lavado a cada columna y centrifugar por 2 minutos. Luego cuidadosamente transferir la columna dentro de un tubo libre de DNAsas/RNAsas
4. Agregar 15µL de agua libre de DNasa/RNasa directamente a la matriz de la columna y centrifugar por 30 minutos.
5. La elución de ARN se almacena a -70 °C.

ANEXO 5. TÉCNICA DE qRT-PCR UTILIZANDO EL ESTUCHE COMERCIAL TaqMan RNA-to-Ct 1-step (Applied Biosystems)

Procedimiento

1. Preparar mix de reacción de acuerdo con la tabla 1.
2. Tomar 19 μ L del mix de reacción y mezclarlo con 1 μ L de la muestra.
3. Programar el termociclador tiempo real de acuerdo con la tabla 3.
4. Interpretar resultados de acuerdo con los valores de corte de la tabla 4.

Tabla 1. Lista de reactivos para la RT-PCR tiempo real

Reactivos	Volumen reacción (20 μ L)	10 reacciones
Agua libre de ARNasas	7.4 μ L	74 μ L
TaqMan® RT-PCR Mix (2 \times)	10 μ L	100 μ L
Primer 1 (40 μ M solución madre)	0.45 μ L	4.5 μ L
Primer 2 (40 μ M solución madre)	0.45 μ L	4.5 μ L
Sonda FAM (25 μ M solución madre)	0.2 μ L	2 μ L
TaqMan® RT Enzyme Mix (40 \times)	0.5 μ L	5 μ L
ARN muestra	1 μ L	

Tabla 2. Secuencias de los iniciadores y la sonda

Nombre del primer	Secuencia	Tm
Fwd primer: Chik 243	5' GAY CCC GAC TCA ACC ATC CT	52.6
Rev primer: Chik 330	5' CAT MGG GCA RAC GCA GTG GTA	55.8
Probe(FAM): Chik 273	5' AGY GCG CCA GCA AGG AGG AKG ATG T	65.6

Tabla 3. Programa de ciclos del termociclador tiempo real

1 ciclo	45 ciclos
50°C por 30 minutos (Reacción de RT)	95°C por 15s
95°C por 15 minutos (activación enzimática)	60°C por 1min

Tabla 4. Valores de interpretación de la sonda TaqMan

Positivo	Valor Ct<38 por duplicado
Equívoco	Valor Ct<38 en uno de los dos pozos
Negativo	Valor Ct>38 por duplicado

ANEXO 6. PROCEDIMIENTO DE LA ELISA PARA LA DETECCIÓN DE IgM ANTI-CHIKV (Inbios)

Permita que se atemperen todos los reactivos antes de usarse (~25°C). Homogenizar todos los reactivos y muestras antes de usarse por medio de suaves inversiones del vial.

Cuidado: este kit no ha sido optimizado para un equipo de ELISA automatizado en particular por InBios. El uso de este tipo de equipo requerirá validación para asegurar resultados iguales a los esperados en este manual. Puede ser necesario modificar el protocolo de estos equipos y/o usar diferentes volúmenes de reactivos.

Preparación de reactivos

- Preparación de la solución amortiguada de lavado. Diluya la solución de lavado 10X a 1X utilizando agua grado reactivo. Para la solución de lavado a 1X, diluya 120 mL de solución de lavado a 10X con 1080 mL de agua destilada o desionizada. Homogenice para asegurar que cualquier precipitado se disuelva. Una vez diluida a 1X, la solución se puede almacenar a temperatura ambiental por hasta 6 meses. Verifique que no esté contaminada antes de usarse. Descártela si se sospecha alguna contaminación.
- Pozos de micro titulación. Seleccione las tiras que correspondan al número de muestras que se vayan a procesar. Evalúe la placa para asegurar que las tiras estén planas y adecuadamente alineadas con la misma. Las tiras que no se utilicen deben resellarse y empacarse inmediatamente con el paquete desecador incluido y almacenadas entre 2-8°C hasta utilizarse o su fecha de caducidad.
- Preparación del conjugado enzimático listo-para-usarse. Adicione 90 µL del conjugado al 100X directamente al vial de Diluyente del conjugado de 9 mL (1:100). Homogenice invirtiendo el vial varias veces. Para volúmenes menores, separe una alícuota del volumen requerido del diluyente en un nuevo vial de polipropileno y afore con el volumen apropiado del conjugado a 100X. Prepare únicamente la cantidad requerida para la prueba en cuestión.

Procedimiento del ensayo

1. Los controles positivos, negativos y de corte deben incluirse por duplicado (e incluirse en cada placa y cada vez que se realice la ELISA). Las muestras no requieren un duplicado. Sin embargo, se recomienda hacer el ensayo con muestras por duplicado hasta que el operador se sienta familiarizado con el procedimiento.

2. Diluya los controles y muestras de suero con la solución de dilución de muestra. Las muestras deben diluirse 1:100 en pozos de dilución limpios o viales de polipropileno. Por ejemplo, diluya 4 μL de muestra en 396 μL de solución de dilución de muestra. Homogenice bien por medio de varios pipeteos consecutivos.

3. Adicione 50 μL de los controles y muestras diluidas 1:100 en los pozos de la placa de ELISA.

4. Cubra la placa con Parafilm, como se muestra en la siguiente ilustración.

Nota: esto asegura una distribución uniforme de calor en todos los pozos; el exceso del Parafilm se puede remover con tijeras una vez que se selle la cubierta de la placa para prevenir evaporación.

Nota: nunca apile las placas de ELISA; deben estar distribuidas individualmente. Esto es muy importante para la distribución de la temperatura. No utilice CO₂ u otros gases. No descansen las placas sobre sustancias húmedas.

5. Incube a 37°C durante 30 minutos (± 1 minuto) en una incubadora de de placas. Esta debe estar calibrada adecuadamente para mantener $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ utilizando un termómetro externo de referencia.

6. Después de la incubación, lave la placa 6 veces con una lavadora de placas automática utilizando la solución de lavado al 1X. Utilice 300 μL por pozo en cada ciclo de lavado.

7. Agregue 50 μL del antígeno de chikungunya a cada pozo de la placa de ELISA. Regrese cualquier sobrante del antígeno a las condiciones apropiadas de almacenamiento (-20°C a -80°C).

8. Cubra la placa con Parafilm.

9. Incube a 37°C durante 30 minutos (± 1 minuto) en una incubadora de de placas.
10. Mientras se está llevando a cabo la incubación, prepare al momento la cantidad mínima necesaria del conjugado de enzima listo-para-usarse, como se describe en la sección de Preparación de Reactivos.
11. Después de la incubación, lave la placa 6 veces con una lavadora de placas automática utilizando la solución de lavado al 1X. Utilice 300 μ L por pozo en cada ciclo de lavado.
12. Adicione 50 μ L del conjugado de enzima listo-para-usarse a cada pozo de la placa.
13. Cubra la placa con Parafilm.
14. Incube a 37°C durante 30 minutos (± 1 minuto) en una incubadora de de placas.
15. Después de la incubación, lave la placa 6 veces con una lavadora de placas automática utilizando la solución de lavado al 1X. Utilice 300 μ L por pozo en cada ciclo de lavado.
16. Aplique 75 μ L del Sustrato Liquido TMB en todos los pozos utilizando un micropipeta multicanal. Nota: El Sustrato Liquido TMB es fotosensible. Evite exponerlo a fuentes de luz innecesarias.
17. Incube la placa en la oscuridad, a temperatura ambiente durante 10 minutos (± 30 segundos).
18. Adicione 50 μ L de Solución de Paro a todos los pozos con una micropipeta multicanal. Permita actuar sin cubrir durante 1 minuto a temperatura ambiente.
19. Mida el valor de la densidad óptica a 450 nm (OD450) con un lector de placas de ELISA. NO RESTE O NORMALIZE VALORES O POZOS EN BLANCO.
20. Analice los resultados

ANEXO 7. PROTOCOLO PARA EL ENSAYO DE EFECTO CITOPÁTICO (CPE)

Materiales

- *Células Vero confluentes en una botella T150 (75cm²) con tapa ventilada
- *Solución de lavado: DPBS o Solución de NaCL 0.09% (estéril)
- *Tripsina-EDTA 1X
- *Medio de crecimiento 1: DMEM suplementado con Suero Bovino Fetal (SBF) inactivado al 10% y gentamicina 1%.
- *Medio de crecimiento 2: DMEM suplementado con Suero Bovino Fetal (SBF) inactivado al 5% y gentamicina 1%.
- *Pipetas serológicas estériles
- *Placa de 12 pozos

Protocolo para pasaje en botellas de T150

1. Remover el medio de crecimiento de la monocapa confluyente de células vero
2. Lavar las células con 10mL de la solución de lavado. Es importante remover cualquier resto de medio porque éste contiene inhibidores de la tripsina
3. Agregar 3mL de Tripsina-EDTA 1X e incubar las células a 37° por 2-3 minutos, hasta que las células comiencen a despegarse del frasco. Agitar suavemente o golpear suavemente el fondo de la botella puede ayudar a las células a despegarse.
4. Agregar 7mL del medio de crecimiento 1 para inactivar la tripsina.
5. Mezclar el medio junto con las células, pipeteando suavemente para disgregar cualquier cúmulo de células. Repetir el pipeteado suave 20 veces.
6. Preparar la dilución de células deseadas de tal manera que las botellas tengan un volumen final con medio de crecimiento 1 de 12-20mL. Las diluciones 1:10 generalmente están confluentes 3 días después.
7. Incubar botellas a 37°C en incubadoras con 5% de CO₂. Cambiar medio cada 3-4 días. Cuando la monocapa de células alcance una confluencia del 90%, realizar el pasaje otra vez repitiendo este protocolo

Protocolo para pasaje a placas de 12 pozos.

1. Realizar pasos 1-5 en una botella T150 con una monocapa confluyente al 90%
2. Agregar 7mL del medio de crecimiento 2 para inactivar la tripsina
3. Mezclar el medio junto con las células, pipeteando suavemente para disgregar cualquier cúmulo de células. Repetir el pipeteado suave 20 veces.
4. Preparar la dilución de células deseadas de tal manera que cada pozo tenga un volumen final con medio de crecimiento 2 de 2mL.

5. Incubar botellas a 37°C en incubadoras con 5% de CO₂.

Medición de efecto citopático

Material

*Medio de crecimiento 2 (DMEM glucosado suplementado con Suero Bovino Fetal (SBF) inactivado al 5% y gentamicina 1%).

*Medio de mantenimiento (DMEM glucosado suplementado con Suero Bovino Fetal (SBF) inactivado al 2% y gentamicina 1%).

*PBS o Solución de NaCL 0.09%

*Agarosa

*Agua grado cultivo celular

*Placas de 6-12 pozos para cultivo celular

•Agarose, UltraPure

Procedimiento de infección

1. Realizar una dilución 1:10-1:20 del sobrenadante del lote de mosquitos con medio de mantenimiento
2. Remover el medio de las placas en una bandeja con hipoclorito de sodio.
3. Agregar 100 µL de cada dilución en cada pozo, dejando que el virus se disperse suavemente dentro del pozo sin perturbar la monocapa.
4. Incubar la monocapa infecta a 37°C por una hora; agitar suavemente las placas cada 15 minutos durante la incubación

Procedimiento de capa de agar

1. Calentar medio de mantenimiento a 42°C en baño maría (20 minutos)
2. Preparar una solución estéril de agarosa 2% con agua destilada estéril utilizando el microondas. Permitir enfriar la agarose unos minutos antes de agregar el medio.
3. Realizar una solución de agarosa al 0.4% utilizando el medio de mantenimiento precalentado como diluyente. Mezclar vigorosamente e inmediatamente agregar 2mL a cada pozo en la placa de 12 pozos.
4. El pipeteo de la solución debe ser por el lado del pozo sin tocarlo.
5. Dejar el plato reposar durante 15 minutos en el gabinete de bioseguridad a temperatura ambiente hasta que el agar se vuelva sólido
6. Mover las placas a una incubadora a 37°C con 5% CO₂

Visualización del Efecto citopático

1. Las placas serán visibles en 2-3 días post infección
2. Fijar las placas agregando 1mL de formaldehído 10%. Incubar al menos 30 minutos
3. Remover el formaldehído y después la agarosa con una espátula de manera cuidadosa.
4. Teñir el pozo utilizando una solución de cristal violeta de tal forma que cubra el fondo de la botella
5. Lavar las placas con agua
6. Dejar secar y observar las unidades formadoras de placas, como evidencia del efecto citopático.

ANEXO 8. PROTOCOLO DE SECUENCIACIÓN PARCIAL PARA LAS REGIONES VIRALES E1 / E2.

Material

- Agua libre de nucleasas
- dNTP's
- SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen – Life technologies)
- Phusion High Fidelity DNA Polymerase Kit (New England Biolabs)
- QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)
- Primers
 - CHIKV9000F: CAGAGCACCGCTGCAACTGCCGAG
 - CHIKV9717R: CATCTGCGTCGTGCACACATG
 - CHIKV9460F: GTGACGCATAAGAAGGAGATCAG
 - CHIKV10308R: CTCCACATGTGCTTCGCTCAATTG
 - CHIKV10059F: CATGGTATTGGAGATGGAGCTTCTG
 - CHIKV10765R: CTATTTGACAGCCAAATGGTGCTG

Procedimiento

1. Usar el estuche “Superscript III RT” para generar el cDNA del ARN viral
 - a. Mix 1
 - i. 5uL agua libre de nucleasas
 - ii. 1uL dNTP
 - iii. 1uL random hexameros
 - iv. 3uL ARN de muestra
 - v. Incubar mix 1 a 65°C por 5 minutos. Después, colocar el tubo en hielo por 2 minutos
 - b. Mix 2
 - i. 4uL MgCl₂
 - ii. 2uL 10X RT buffer
 - iii. 2uL DTT
 - iv. 1uL RNaseOUT
 - v. 1uL SSIII enzyme
 - c. Agregar mix 2 al mix 1
 - d. Incubar por 10 minutos a temperature ambiente
 - e. Incubar a 43°C por 90 minutos
 - f. Incubar a 50°C por 10 minutos
 - g. Puede ser almacenado a 4°C durante la noche o congelar a -20°C
2. Generar amplicones con el estuche Phusion PCR
 - a. Mezclar
 - i. 10uL 5X Buffer
 - ii. 1uL dNTP
 - iii. 1uL F primer (20uM)
 - iv. 1uL R primer (20uM)
 - v. 32uL nuclease free H₂O
 - vi. 2uL MgCl₂

- vii. 0.5uL Phusion polymerase
 - viii. 2.5uL cDNA
 - b. Pareja de oligos:
 - i. CHIKV 9000F + CHIKV 9717R (Tm 59°C)
 - ii. CHIKV 9460F + CHIKV 10308R (Tm 55°C)
 - iii. CHIKV 10059F + CHIKV 10765R (Tm 55°C)
 - c. Condiciones del termociclador
 - i. 98°C: 30 segundos
 - ii. Desnaturalización: 98°C: 10 segundos
 - iii. Alineamiento 59°C o 55°C: 10 segundos
 - iv. Elongación: 72°C: 30 segundos
 - v. 40 ciclos pasos ii-iv
 - vi. Elongación final: 72°C: 7 minutos
 - vii. 4°C: indefinido
3. Aislamiento del producto de PCR del gel
1. Correr electrophoresis del producto en gel de agarosa 1% en TAE 1x
 - a. Agregar 10uL de colorante 6x al tubo de PCR y agregar mezcla al carril del gel.
 2. Cortar bandas del correcto tamaño.
 3. Usar el estuche “QIAquick Gel Extraction” para purificar el fragmento de cDNA
 - a. Pesarse trocito de gel en el tubo. Agregar 3 volúmenes del Bugger QG a un volumen de gel
 - b. Incubar a 50°C por 10 minutos (o hasta que el trozo de gel se disuelva). Agitar con vórtex cada 2-3 minutos para asegurar que el gel se haya disuelto.
 - c. Colocar la columna “QIAquick spin” en un tubo de colección de 2mL
 - d. Agregar hasta 700uL de la solución gel/buffer a la columna. Centrifugar por 1 minuto a 13,000 rpm.
 - e. Descartar desecho y colocar la columna dentro del mismo tubo de colección. Repetir este paso hasta que toda la solución de buffer/gel haya sido agregada.
 - f. Agregar 0.5mL del buffer QG a la columna y centrifugar por 1 minuto a 13,000 rpm. Descartar el desecho.
 - g. Agregar 0.75mL del buffer PE a la columna. Incubar a temperatura ambiente por 10-20 minutos (importante para asegurar un resultado de secuenciación limpio). Centrifuge a 13,000 rpm por 1 minuto. Descarte el desecho.
 - h. Centrifugue la columna por 1 minuto adicional a 13,000 rpm para asegurar la remoción completa del buffer PE.
 - i. Colocar la columna en un microtubo de 1.5mL limpio.
 - j. Para eluir el ADN, agregar 35uL de agua libre de nucleasas al centro de la membrana de la columna. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar a 13,000rpm para coleccionar el ADN eluido.
 4. El cDNA y los oligos a 2uM pueden ser enviados al laboratorio de secuenciación para el diseño de la secuenciación sanger. Use los mismos oligos como en el paso 2b.

ANEXO 9. EXTRACCIÓN DE ARN UTILIZANDO EL ESTUCHE QIAMP VIRAL RNA

Pasos previos

- Atemperar muestras a temperatura ambiente (15-25°C)
- Atemperar amortiguador AVE a temperatura ambiente.
- Preparar solución AVE-Acarreador de ARN
 - Mezclar 310 µL del amortiguador AVE en 310µg liofilizados del acarreador de ARN, concentración fina 1µg/1µL. Hacer alícuotas de 50µL y almacenar de -30 a -15°C
- Preparar amortiguador AW1
 - Para 50 muestras, mezclar 19mL del concentrado AW1 con 25mL de etanol 96-100%
- Preparar amortiguador AW2
 - Para 50 muestras, mezclar 13mL del concentrado AW2 con 30mL de etanol 96-100%.
- Preparar solución AVL-Acarreador ARN (viable solo por 48 horas)
 - Por cada muestra, se deben mezclar 560 µL del amortiguador AVL en 5.6µL de la solución AVE-Acarreador ARN. Solo debe usarse fresco y calcular el volumen final dependiendo las muestras a procesar.

Procedimiento

1. Tomar 560 µL de la solución AVL-Acarreador ARN y depositarlo dentro de un microtubo de 1.5mL
2. Tomar 140µL de suero y mezclarlo con la solución AVL-Acarreador de ARN dentro del microtubo. Mezclar con Vortex durante 15 s.
3. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
4. Centrifugar brevemente el tubo para remover gotas del interior de la tapa.
5. Agregar 560 µL de etanol (96-100%) a la muestra, y mezclar con Vortex durante 15 s. Después, centrifugar brevemente para remover gotas del interior de la tapa.
6. Cuidadosamente agregar 630 µL de la solución del paso 5 a la columna QIAamp Mini (dentro de un tubo de colecta de 2mL) sin mojar el borde. Cerrar la tapa y centrifugar a 6000 g por 1 minuto. Mover la columna dentro de un tubo de colección de 2mL limpio, y descartar el tubo que contiene el filtrado.
7. Cuidadosamente abrir la columna QIAamp y repetir el paso 6.
8. Cuidadosamente abrir la columna QIAamp y agregar 500 µL de la solución amortiguadora AW1. Cerrar la tapa y centrifugar a 6000g por 1 minuto. Mover la columna dentro de un tubo de colección de 2mL limpio y descartar el tubo que contiene el filtrado.
9. Cuidadosamente abrir la columna QIAamp y agregar 500 µL de la solución amortiguadora AW2. Cerrar la tapa y centrifugar a máxima velocidad (20,000 g) por 3 minutos.
10. Mover la columna QIAamp a nuevo tubo de colección de 2mL y descartar el viejo tubo con el filtrado. Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto.

11. Mover la columna QIAamp a un microtubo de 1.5mL. Descartar el tubo antiguo con el filtrado. Cuidadosamente abrir la columna y agregar 60 μ L de la solución AVE atemperada. Cerrar la tapa e incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar a 6000g por 1 minuto. Descartar columna y almacenar microtubo que contiene la elución de ARN a -70°C.

ANEXO 10. PROTOCOLO PARA LA QRT-PCR TIEMPO REAL DEL CDC

5. Preparar mix reacción de acuerdo con la tabla 1.
6. Mezclar 40µL del mix de reacción con 10µL del ARN de muestra
7. Programar el termociclador tiempo real de acuerdo con la tabla 3.
8. Interpretar resultados de acuerdo con los valores de corte de la tabla 4.

Tabla 1. Lista de reactivos para la RT-PCR tiempo real

Reactivos	Volumen por reacción	10 reacciones
Agua libre de ARNasas	13.2 µL	132 µL
2× Ready mix	25 µL	250 µL
Iniciador 1 (100 µM solución madre)	0.5 µL	5 µL
Iniciador 2 (100 µM solución madre)	0.5 µL	5 µL
Sonda FAM (25µM solución madre)	0.3 µL	3 µL
Mix de enzimas	0.5 µL	5 µL

Tabla 2. Secuencias de los iniciadores y la sonda

Iniciadores	Secuencia
Iniciador 1: CHIK 856	ACCATCGGTGTTCCATCTAAAG
Iniciador 2: CHIK 962c	GCCTGGGCTCATCGTTATT
CHIK 908FAM	ACAGTGGTTTCGTGTGAGGGCTAC

Tabla 3. Programa de ciclos del termociclador tiempo real

1 ciclo	45 ciclos
50°C por 30 minutos (Reacción de RT)	95°C por 15s
95°C por 15 minutos (activación enzimática)	60°C por 1min

Tabla 4. Valores de interpretación de la sonda TaqMan

Positivo	Valor Ct<38 por duplicado
Equívoco	Valor Ct<38 en uno de los dos pozos
Negativo	Valor Ct>38 por duplicado

ANEXO 11. COMPILACIÓN DE LOS DATOS CLÍNICOS Y ANÁLISIS DE LABORATORIO MÁS RELEVANTES DURANTE LOS DIFERENTES BROTES DE CHIKV ALREDEDOR DEL MUNDO

Publicación	Borgherini <i>et al.</i> 2007	Staikowsky <i>et al.</i> 2009*	Thiberville <i>et al.</i> 2013	Reller <i>et al.</i> 2013	Win <i>et al.</i> 2010	Nkoghe <i>et al.</i> 2012	Mattar <i>et al.</i> 2015	Sahadeo <i>et al.</i> 2015	Macpherson <i>et al.</i> 2016
Localidad y fecha	La Reunion (2005-2006)	La Reunion (2005-2006)	La Reunion (2006)	Sri Lanka (2007)	Singapur (2008)	Gabón (2010)	Colombia (2014)	Trinidad & Tobago (2014)	Granada (2014)
Total de pacientes incluidos	157	274	76	797	97	270	100	158	493
Pacientes positivos a CHIKV (%)	100	65.7 / 12.4	71.1	3.5	100	100	25.0	22.0	86.0
Genotipo / Linaje	ECSA (IOL)	ECSA (IOL)	ECSA (IOL)	ECSA (IOL)	Desconocido	ECSA	Asiático (Caribe)	Asiático (Caribe)	Probablemente Asiático
Edad (Media o Mediana)	57.9	55.0	40.0	41	37.0	30.0	39	32	34.5
Relación Hombre / Mujer	1.2	1.1 / 0.6	1.7	6.8	3.4	0.9	0.6	0.6	0.5
Días de iniciado los síntomas	2.1	1.8 / 6.2	1.2	3.0	2-4	2.0	2.9	2.4	-
Fiebre (%)	89.0	19.4 / 0.0	100	100	89.7	85.0	100	100	88.6
Artralgia (%)	96.0	98.8 / 96.8	100	71.0	87.6	90.4	88	83.3	90.0
Mialgia (%)	-	59.0 / 59.0	74.0	82.0	-	72.9	28	70.0	66.7
Dolor de cabeza (%)	47.1	70.0 / 58.8	72.0	75.0	-	71.8	64	76.7	53.9
Exantema (%)	40.1	47.8 / 67.7	30-50	11.0	-	41.8	56	33.0	42.9
Alteraciones digestivas (%) [‡]	47.1	63.3 / 85.3	13-44	11.0-38.0	-	32.0	4-6	16-26	26.9
Conjuntivitis (%)	-	22.8 / 17.7	-	36.0	-	-	-	-	-
Adenopatía (%)	8.9	8.9 / 29.4	-	18.0	-	-	8	-	28.8
Sangrado (%)	6.4	1.1 / 8.8	8.0	-	1.0	2.2	-	10.0	-
Artritis	31.8	-	-	0.0	-	-	-	-	-
Edema	-	25.6 / 44.0	-	-	-	-	-	-	25.1
Alta creatinina (>120 µmol/L) [‡]	27.4 %	111.1±73.1 / 104.2±1099	-	-	-	96.0±32.0	-	-	-

Alta AST (>37 U/L)£	45.9%	55.0±164 / 53.2±42.3	28%	-	3.0%	45.0±35	-	-	-
Alta ALT (>65 U/L)£	16.6%	35.2±89.7 / 39.5±29.9	14.0%	-	8.0%	33.0±17.0	-	-	-
Alta CRP (>3 mg/dL)£	67.5%	5.6±5.0 / 3.1±5.0	33.0%	-	-	-	-	-	-
Leucopenia (<4500 cel/mm ³)£	5153±2198	5431±2139 / 5199±2554	-	4500	3500±1900	-	-	6500±3250	-
Linfopenia (<1000 cel/mm ³)£	79%	608 ±314 / 1090±481	79.6%	1305	-	2228±216	-	-	-
Trombocitopenia (<100 x 10 ³ plaquetas/mm ³)£	9.5%	174.2±56.0 / 173.7±62.2	24.0%	181.0	1.0%	233.1± 81.8	-	234.0± 72.5	-

*Este estudio reporta para pacientes virémicos / post-viremicos.

£ Los valores pueden estar representados como porcentajes o medias / medianas con sus respectivas unidades dependiendo del parámetro medido

¥ Alteraciones digestivas incluye dolor abdominal, nausea, vómito y diarrea

RESUMEN BIOGRÁFICO

Esteban Eduardo Díaz González

Candidato para el Grado de
Doctor en Ciencias Biológicas con acentuación en Entomología Médica

Tesis: EMERGENCIA DEL VIRUS CHIKUNGUNYA (CHIKV) EN CHIAPAS, MÉXICO:
TENDENCIAS EN PATRONES EPIDEMIOLÓGICOS E INCRIMINACIÓN DE
VECTORES

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Datos personales: Nacido en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, el 14 de septiembre de 1990, hijo de José Díaz Martínez[†] y Leticia González García.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2013.

Experiencia profesional: Auxiliar de investigador en el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, UANL, de agosto del 2015 a agosto del 2016; docente del Centro de Bachillerato Tecnológico Industrial y de Servicios de agosto del 2016 a octubre del 2017; docente de la Escuela Secundaria Técnica 102 “Profr. Edmundo Guajardo Acosta” desde agosto del 2016.