

Marcadores de respuesta inmune en pacientes con infección aguda, crónica y fatal por virus del Chikungunya en Colombia, durante la epidemia del 2015.

Tesis para optar el título de Magister en Epidemiología

Autor:

Cindy Arteta Acosta

Universidad del Norte

Departamento de Salud Pública

Maestría en Epidemiología

Barranquilla, Colombia

15 de junio del 2018

Marcadores de respuesta inmune en pacientes con infección aguda, crónica y fatal por virus del Chikungunya en Colombia, durante la epidemia del 2015.

Tesis para optar el título de Magister en Epidemiología

Autor:

Cindy Arteta Acosta

Tutor: Jorge Luis Acosta Reyes

MD, MSc, Coordinador Maestría en Epidemiología clínica

Universidad del Norte

Departamento de Salud Pública

Maestría en Epidemiología

Barranquilla, Colombia

15 junio del 2018

Nota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Barranquilla, 15 de junio del 2018

Dedicatoria

A Dios y a mi familia por ser mi motor, mi impulso día a día.

Gracias por la espera y por la paciencia infinita...

Agradecimientos

Al Dr Wilfrido Coronell Rodríguez y al Dr Álvaro Monterrosa Castro, quienes han sembrado en mí el interés por la investigación, han sido un ejemplo a seguir y me han ayudado a crecer como investigadora, como médica y como persona.

A mi profesor guía, Jorge Acosta Reyes y al Dr Edgar Navarro Lechuga, por su paciencia, orientación y por darme la oportunidad de llevar a cabo esta investigación.

A la Dra Julia Pimienta por transmitir con amor y cariño sus conocimientos.

A la Profesora Rosa Baldiris, Marlon Macías, Alfredo Montes y todo su equipo de trabajo, quienes me acogieron en su hermandad y familia de investigación.

A mis amigas, Liezel Ulloque, Saabad Mejía y Carmen Blanco, quienes me apoyaron día a día para continuar hasta el final.

Al resto del equipo de la Universidad del Norte y del Instituto Nacional de Salud, por su disponibilidad en pro de la investigación.

Tabla de contenido

Dedicatoria	4
Agradecimientos	5
Abreviaturas y Acrónimos	8
Lista de Gráficos	10
Lista de Tablas	11
Lista de Ilustraciones	12
Resumen	13
Abstract	15
1. Introducción	17
2. Objetivos	23
2.1 Objetivo general.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3. Marco teórico	24
3.1 Epidemiología.....	24
3.2 El vector.....	26
3.3 El Virus del Chikungunya.....	27
3.4. Inmuno-patogenicidad del Virus.....	31
3.5 Transmisión materno-fetal.....	35
3.6 Presentación clínica.....	36
3.7 Factores asociados a severidad y mortalidad por Fiebre de Chikungunya.....	38
3.7.1 Mortalidad por Chikungunya.....	40
3.8 Parámetros de laboratorio.....	40
3.9 Definición de caso.....	41
3.10 Diagnóstico.....	45
3.11 Manejo.....	47
3.12 Vacunas.....	48
4. Metodología	49
4.1 Tipo de estudio.....	49
4.2 Tamaño de la muestra.....	51
4.3 Variables.....	51

4.4. Control de sesgos.....	52
5. Plan de recolección de datos	53
5.1 Selección de muestras.....	53
5.2 Pruebas moleculares	53
6. Aspectos éticos	55
7. Plan de procesamiento	55
8. Resultados.....	57
9. Discusión.....	66
10. Sesgos y Limitaciones.....	71
Conclusiones	72
Referencias bibliográficas.....	73
Anexos	89

Abreviaturas y Acrónimos

AINES	Anti-inflamatorios no esteroideos
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	Ácido ribonucleico de interferencia
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASCOS	Genotipo de África Sur-Central-Oriental
BFV	Virus del bosque Barmah
CpG ODNs	CpG oligodeoxinucleotidos
CDC	Center for disease control and prevention
DALYs	Siglas en inglés disability-adjusted life years, años de vida ajustados por discapacidad
DC-SIGN	por sus siglas en inglés dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin 1
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FChik	Fiebre de Chikungunya
GM-CSF	Factor estimulante de colonias monocitos-granulocitos, siglas en inglés granulocyte monocyte colony-stimulating factor
IL	Interleucina
IRF	Interferón regulatory factor
IFN	Interferón
INS	instituto nacional de salud
LOI	Linaje del océano Indico
L-SIGN	Por sus siglas en inglés, liver and lymph node-SIGN
MAYV	Mayaro virus

MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PCR	Por siglas en inglés polymerase chain reaction, reacción en cadena de la polimerasa
pDC	Por siglas en inglés plasmacytoid dendritic cell precursors
PRNT	Prueba de neutralización por reducción de placas
RT-PCR	Por siglas en inglés, reverse-transcriptase PCR, PCR transcriptasa reversa
SDOM	Síndrome de disfunción de órgano múltiple
SE	Semana Epidemiológica
SINV	Sinbdis virus
siRNAs	ARN de interferencia pequeño de 21 nucleótido, siglas en inglés small interfering RNAs
SNC	Sistema nervioso central
TNF	Factor de necrosis tumoral, siglas en inglés tumoral necrosis factor
USD\$	por sus siglas en inglés United States dollars, dólares americanos
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
VCHIK	Virus del Chikungunya
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
VRR	Virus Río Ross

Lista de Gráficos

- Gráfico 1.** Comparación de citocinas pacientes con enfermedad aguda Vs fatal 61
- Gráfico 2.** Citocinas de pacientes con enfermedad aguda fatal y enfermedad crónica..... 65
- Gráfico 3.** Presencia de citocinas de acuerdo a evolución de la enfermedad..... 70

Lista de Tablas

Tabla 1. Macrovariables y variables	51
Tabla 2. Variables sociodemográficas pacientes con FChik aguda no fatal Vs fatal	58
Tabla 3. Comparación de citocinas en pacientes agudos y fallecidos por VCHIK.	59
Tabla 4. Variables sociodemográficas pacientes con FChik aguda Vs crónica	62
Tabla 5. Comparación de citocinas en pacientes con infección aguda y crónica por CHIKV	63
Tabla 6. Comparación de citocinas en pacientes con infección crónica y fallecidos por VCHIK.....	64
Tabla 7 Anexo. Operacionalización de variables	92

Lista de Ilustraciones

Ilustración 1. Genoma del virus chikungunya.....89

Ilustración 2. Ciclo de replicación alfavirus90

Ilustración 3. Diseminación del virus en humanos91

Resumen

Introducción: Antes del 2014 en el mundo occidental poco se hablaba del virus del Chikungunya; en la actualidad es considerado un problema de salud pública, no solo por la incapacidad y el deterioro en la calidad de vida que genera, sino también por las complicaciones fatales a las que puede estar asociado.

Objetivo: Determinar los marcadores de respuesta inmune (citocinas inflamatorias, quimioquinas, factor de crecimiento y coagulación) en pacientes con infección aguda, crónica y fatal por virus del Chikungunya en Colombia, durante la epidemia del 2015.

Metodología: estudio observacional descriptivo transversal, llevado a cabo en muestras serológicas de pacientes con diagnóstico de caso confirmado por laboratorio para enfermedad aguda, crónica y fatal por virus del Chikungunya. Las muestras fueron suministradas por el laboratorio de virología del Instituto Nacional de Salud, y fueron procesadas en el laboratorio de microbiología de la Universidad del Norte, donde se cuantificó por un kit comercial el perfil de 13 citocinas.

Resultados: un total de 164 muestras fueron analizadas, 50 de pacientes con enfermedad aguda no fatal, 25 de casos confirmados que fallecieron por causa directa o indirecta por el VCHIK y 89 de pacientes con enfermedad crónica. La mediana de tiempo de la toma de muestra fue de 4.5 [RIQ 3] días para los pacientes con enfermedad aguda no fatal y de 7 [RIQ 1.75] días para los pacientes que fallecieron. El promedio de edad para la población total fue de 48.2 años \pm 24.4 DE. La forma aguda de la enfermedad fue más prevalente en las edades extremas de la vida (<10 años y >70 años), y la forma crónica de la enfermedad en los adultos jóvenes y adultez intermedia (20-60 años), siendo significativas estas diferencias ($p < 0.05$). Diez citocinas plasmáticas (IFN-gamma, IL-10, IL-13, IL-17a, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TGF- α , TNF- α) estuvieron significativamente elevadas en los pacientes fallecidos comparado con los pacientes con infección aguda ($p < 0.005$). En pacientes con EAF, la IL-6 fue la citocina proinflamatoria con el valor de mediana

más alto y entre las citocinas anti-inflamatorias, la IL-10. Los pacientes con **enfermedad crónica** tuvieron en promedio 47.5 años \pm 15.7 DE. A excepción de GM-CSF e IL-12, la comparación de medianas entre pacientes fallecidos y pacientes con enfermedad crónica (IFN-gamma, IL-10, IL-13, IL-17a, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, LT- α /TNF- β , TGF- α , TNF- α) presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Los niveles de IL-6 e IFN- γ estuvieron ocho y dos veces más elevados en pacientes con enfermedad aguda que en el grupo con enfermedad crónica.

Conclusión: Este es el primer estudio realizado en Colombia, que aporta evidencia sobre los niveles de citocinas en las fases aguda, aguda con desenlace fatal y crónica de pacientes con FChik. Pacientes con infección aguda tiene aumento en las citocinas IFN- γ , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17a y TNF- α , las cuales si persisten por más de tres meses elevadas con algo de disminución de los niveles de IFN- γ e IL-6, pueden indicar progresión de la enfermedad hacia la fase crónica. En cambio, si además de las citocinas de la fase aguda hay incremento de IL-2, IL-4, IL-13, LT- α /TNF- β , TGF- α , la enfermedad puede estar avanzando a un cuadro severo e incluso la muerte. El estudio de las citocinas en especial la IL-6, junto con otros biomarcadores inmunológicos, cada día se convierten en una herramienta de seguimiento, evolución y pronóstico de la enfermedad por VCHIK.

Palabras claves: Virus Chikungunya, Citocinas, Enfermedad Aguda, Enfermedad Crónica, Resultado Fatal

Abstract

Introduction: Before 2014 in the western world, little was said about the Chikungunya virus; it is currently considered a public health problem, not only because of the disability and deterioration in the quality of life that it generates, but also because of the fatal complications that can occur.

Aim: To determine the markers of immune response (inflammatory cytokines, chemokines, growth factor and coagulation) in patients with acute, chronic and fatal infection by Chikungunya virus in Colombia, during the epidemic in 2015

Methods: cross-sectional descriptive observational study, carried out in serological samples of patients with laboratory-confirmed case diagnosis for acute, chronic and fatal Chikungunya virus disease. The samples were supplied by the virology laboratory of the National Institute of Health and were processed in the microbiology laboratory of the Universidad del Norte, where a profile of 13 cytokines was quantified by a commercial kit.

Results: a total of 164 samples were analyzed, 50 of patients with acute non-fatal disease, 25 of confirmed cases who died by direct or indirect cause of VCHIK and 89 of patients with chronic disease. The median time taken for the sample was 4.5 [RIQ 3] days for patients with acute nonfatal disease and 7 days [RIQ 1.75] days for patients who died. The average age for the total population was 48.2 years \pm 24.4 SD. The acute form of the disease was more prevalent in the extreme ages of life (<10 years and > 70 years), and the chronic form of the disease in young adults and intermediate adults (20-60 years), these being significant differences ($p < 0.05$). Ten plasma cytokines (IFN-gamma, IL-10, IL-13, IL-17a, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TGF- α , TNF- α) were significantly elevated in patients deceased compared to patients with acute infection ($p < 0.005$). In patients with FAD, IL-6 was the proinflammatory cytokines with the highest median value and among the anti-inflammatory cytokines, IL-10. Patients with chronic disease averaged 47.5 years \pm 15.7 SD. With the exception of GM-CSF and IL-12, the comparison of medians between deceased

patients and patients with chronic disease (IFN-gamma, IL-10, IL-13, IL-17a, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, LT- α / TNF- β , TGF- α , TNF- α) presented statistically significant differences ($p < 0.05$). The levels of IL-6 and IFN- γ were eight and two times higher in patients with acute disease than in the group with chronic disease.

Conclusion: This is the first study conducted in Colombia, which provides evidence on cytokine levels in the acute, acute phases with fatal and chronic outcome of patients with Chikungunya. Patients with acute infection have an increase in the cytokines IFN- γ , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17a and TNF- α , which if persisted elevated for more than three months with some decreased levels of IFN- γ and IL-6, may indicate progression of the disease towards the chronic phase. On the other hand, if in addition to the cytokines of the acute phase, there is an increase in IL-2, IL-4, IL-13, LT- α /TNF- β , TGF- α , the disease may be progressing to a severe condition and even death. The study of cytokines, especially IL-6, together with other immunological biomarkers, is becoming a tool for monitoring, evolution and prognosis of the disease by chikungunya virus.

Keywords: Chikungunya virus, Cytokines, Acute Disease, Chronic Disease, Fatal Outcome.

1. Introducción

Las enfermedades transmitidas por vectores como Dengue, Zika y Chikungunya, se han convertido en un problema de salud pública debido a la rápida diseminación de los brotes, la alta tasa de ataque y la carga que esto supone sobre los sistemas de salud, especialmente en países en vía de desarrollo (1–4). El impacto de estas enfermedades no puede limitarse a la afección de la salud de las personas, sino que debe incluirse tanto consecuencias directas e indirectas sobre la calidad de vida (2,5,6).

La fiebre del Chikungunya (FChik), es una enfermedad transmitida por artrópodos, causada por el virus del Chikungunya (VCHIK), del cual no se tenía conocimiento hasta la década de los 50' cuando fue descrito como un brote en el sur de Tanzania (7). Ha re-emergido en forma de epidemias, primero en el hemisferio oriental y desde los últimos años en el hemisferio occidental (8–11), convirtiéndose en un serio problema de salud pública dada su alta morbilidad e incluso mortalidad en algunos casos (12,13).

Entre marzo de 2005 y diciembre de 2006 en la Isla La Réunion del Océano Índico, se registró uno de los brotes más grandes de esta región, afectando al 40% de la población, con 254 muertes atribuidas de forma directa o indirecta al VCHIK, para una tasa de letalidad de 1/1000 casos (14,15). Ese mismo año (2006) en la India, se reportaron 1.25 millones de casos, con una tasa de ataque de 45% (16) y una letalidad de 11.9% (1,17).

El 5 de diciembre de 2013, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y Organización Mundial de la Salud (OMS) confirmaron el primer caso autóctono de FChik en la Isla francesa Saint Marteen (a 150 millas de Puerto Rico) y declararon la alerta sanitaria (8). El VCHIK se extendió en 12 meses a más de 45 países del continente americano, siendo el mayor pico de la enfermedad los primeros tres meses y la mayor tasa de ataque en Surinam (90.4%) y República Dominicana

(41.0%) (18–20). Para el 2017, en el continente Americano se reportaron 2.4 millones de casos y 340 muertes (21).

En Colombia, el 15 de julio del 2014 ingresó a Palmira/Valle una mujer de 71 años procedente de República Dominicana con diagnóstico clínico de FChik, cuatro días más tarde (19 de julio) el caso es confirmado serológicamente por el Instituto Nacional de Salud (INS) (22). El 11 de septiembre del mismo año, el INS confirmó mediante reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa inversa (RT-PCR), el primer caso autóctono de FChik en el corregimiento de San Joaquín, municipio de Mahates-Bolívar, y al finalizar el año un total de 106.763 casos habían sido notificados (22). El pico máximo de la enfermedad se presentó en el año 2015 con 359.728 casos (98.9% confirmados por clínica), de los cuales se confirmaron 54 casos fatales, para una tasa de letalidad de 0.015% (23). En los años posteriores, ha habido un descenso de FChik, para el 2016 se notificaron 19.566 casos y 8 muertes (24), en el 2017 se notificaron 1.128 casos (25) y hasta la semana epidemiológica 13 del 2018, el INS ha notificado un total de 152 casos sin especificar casos fatales (26).

Los principales problemas derivados del VCHIK han sido:

1. Su difícil contención, al ser un virus transmitido por vectores (principalmente la hembra del mosquito *Aedes aegypti*), su diseminación y expansión es rápida en regiones tropicales donde el vector es endémico (10,11,27). Incluso se ha asociado el resurgir con mutaciones en el genoma viral lo que ha permitido la replicación del virus en mosquitos como *Aedes albopictus* (28),
2. A diferencia del virus del Zika, la tasa de casos asintomáticos es muy baja. Entre un 72-97% de las personas desarrollan síntomas caracterizados por fiebre, cefalea, mialgia, rash y dolor articular que demandan una mayor atención médica (29),
3. Algunos pacientes pueden persistir con dolor articular por meses o por años, considerándose ésta la forma crónica y severa de la enfermedad, (10) que puede

variar entre 14.4-87.2%. Un modelo matemático, estimó en Latino-América una prevalencia de 47.5% (IC95% 45.0-50.1) de las formas crónicas inflamatorias post-Chikungunya (30), mientras que una revisión sistemática sugirió que la prevalencia podría estar entre 27.2%-50.2% (31),

4. Como en otras patologías, los extremos de la vida se han visto asociados con una presentación más severa de la enfermedad (12,29). En el caso de los neonatos, si la infección es adquirida en los primeros meses del embarazo, no parece tener impacto en el desarrollo fetal como sucede con el virus del Zika (32,33), pero si la madre adquiere la enfermedad en el periodo perinatal (5 días antes y dos días después del parto), la transmisión vertical puede estar presente hasta en el 50% de los casos (12), lo cual ha sido asociado con síntomas severos agudos, como encefalopatía (36-47%), artromialgias (100%), trombocitopenia (76%-89%), linfopenia (47%) convulsiones febriles (15.7%), edema periférico (58%) y rash ampoloso (82%) (12,34), así mismo, se pueden presentar complicaciones a largo plazo como alteración del desarrollo cognitivo en áreas de coordinación, lenguaje, movimiento y respuesta social (12,34).

5. Es importante tener en cuenta que al estar en una zona endémica de otras arbovirosis como el virus del dengue y virus del Zika, la co-existencia de estas enfermedades puede incrementar la mortalidad de 2% a 12% (p 0.04), con mayor necesidad de ventilación mecánica y transfusión sanguínea (35–41).

6. La mortalidad por FChik es rara (<0.1% de los casos hospitalizados), históricamente había sido considerada como una patología auto-limitada y no mortal, hasta que se documentaron casos fatales en los brotes ocurridos en la isla La Réunion (14,15), en la India (1,2), Mauritius (42) y más recientemente la epidemia ocurrida en las Américas también dejó casos fatales en diferentes regiones, con una tasa estimada de 0.012% (12,17,38,43). Este desenlace fatal puede ser atribuido a que todos estos pacientes padecían comorbilidades como hipertensión arterial, diabetes mellitus, falla cardíaca crónica e insuficiencia renal que pudieron

exacerbarse por el VCHIK, alcanzando una mortalidad hasta del 26% en sala de hospitalización y 27% en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) (13). Por tanto, se ha descrito que este desenlace se presenta, usualmente, en pacientes mayores de 60 años, con comorbilidades asociadas y con manifestaciones parecidas al dengue (trombocitopenia, leucopenia, hemoconcentración y choque) (38,43).

Por otra parte, las complicaciones neurológicas (25-33%) son las formas más frecuentes, severas atípicas y potencialmente fatales, dentro de ellas, la encefalitis es la más común (11-18%) (44,45). Otras alteraciones son las convulsiones, la tetraparesia y alteraciones del estado de conciencia (44,45). Así mismo, las complicaciones cardíacas (insuficiencia cardíaca, arritmias y miocarditis) se observan en un 13%, seguido de otras complicaciones de tipo renal, ocular y hepático (13,46). Como consecuencia del incremento de estas formas atípicas de presentación, en los últimos años la investigación científica ha sido enfocada en la búsqueda de marcadores moleculares que permitan diferenciar los pacientes con un curso normal de la enfermedad, de aquellos con una forma severa de la misma. Dentro de estos, el campo de la inmunología y la biología molecular han permitido establecer diferencias en el curso de la enfermedad, encontrando que los pacientes con elevación de dos citocinas específicas Interleucinas (IL)-**1 β** , **IL-6** junto con la disminución de los niveles de **RANTES** (ó CCL5) están asociados con la presencia de **Chikungunya severo**, a su vez pueden diferenciar una fase aguda de una fase crónica de severidad, donde la expresión de IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IFN- α , Eotaxin, la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), MIG y disminución de RANTES están asociados a **Chikungunya agudo severo**, mientras que el incremento de IL-1 α , IL-1 β , IL-2R, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IFN- α , IL-12, IL-15, MCP-I, MIP-1 α , Eotaxin, RANTES, IP-10, MIG, EGF, FGF-b, G-CSF y HGF se asocian a **Chikungunya crónico severo** (47). De forma consistente, otro estudio encontró que los pacientes con formas severas tenían altas concentraciones de IL-6 y MCP-1 con bajas concentraciones de IL-8 (48)

El factor regulador de interferón (IRF, interferon regulatory factor) es un importante inductor de IFN- α , una citocina antiviral que hace parte del IFN-I, es producida unas 100 a 1000 veces más por las células dendríticas plasmocitoides (subgrupo de células dendríticas con forma similar a las células plasmáticas) (49,50) y en menor medida por los monocitos (51), utilizando las vías de receptores tipo RIG (RLR, por siglas en inglés RIG like receptors) y receptores tipo Toll (TLR, siglas en inglés Toll like receptors) 3 y 7 (52). La importancia del factor regulador de interferón fue demostrada en un experimento con ratones deficientes de IRF-7 y/o IRF-3 (52), los cuales no tuvieron niveles detectables de IFN- α/β en sangre, como consecuencia presentaron elevación de la carga viral, IFN- γ , factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés, tumoral necrosis factor), IL-6 y MCP-1, lo cual contribuyó a la presencia de edema y hemorragia por aumento de la permeabilidad capilar, trombocitopenia y shock hipovolémico tal como se ha descrito en algunos casos de Chikungunya neonatal y del adulto mayor (14,38,41). Así mismo, se ha encontrado que la pérdida de la señalización mediante TLR-3 agrava la patología por la infección del VCHIK (53). Por tanto, los altos niveles en sangre de IFN- α/β y una buena señalización por medio de TLR son importantes factores protectores contra la infección por el VCHIK y explica la forma como el cuerpo puede controlar rápidamente la viremia (50).

Los marcadores biológicos como las citocinas, son identificadas como potenciales biomarcadores para reconocimiento, predicción de progresión y tratamiento de infección y sepsis. Estudios han demostrado que el incremento de los niveles de citocinas en plasma se correlacionan con el síndrome de disfunción de órgano múltiple (SDOM), severidad de daño y mortalidad (54–56). Los niveles plasmáticos de IL-6 han demostrado ser predictores de sepsis en modelos murinos (57), los datos en humanos son controversiales (58–60), aunque un estudio encontró que esta citocina tiene mejor precisión, especificidad y sensibilidad (84.7%, 98.3% y 16.7%, respectivamente) en pacientes con SDOM que la IL-8 e IL-10 (61). Otro estudio encontró que, el incremento de estas citocinas (IL-6, IL-8 e IL-10) en

pacientes severamente enfermos con falla renal aguda incrementa el riesgo de morir en 65%, 54% y 34%, respectivamente (62). De igual forma, se ha demostrado que las citocinas TNF- α , IL-8, IFN- γ , IL-1ra, IL-4, IL-10 presentan más incremento y se relacionan con mayor mortalidad RR 4.7, 4.6, 1.5, 3.3 veces más en sepsis abdominal por bacterias gram negativas que por gram positivas (63).

La determinación de biomarcadores inmunológicos específicos para predecir curso y desenlace de la FChik, podría ser ventajoso en los pacientes considerados con factores de riesgo para desarrollar enfermedad severa o atípica. Hasta el momento, los estudios inmunológicos de la FChik, se han enfocado en estos marcadores para diferenciar la fase aguda de la crónica (64–66), y pocos han evaluado estos marcadores en la diferenciación de pacientes fallecidos de los sobrevivientes por fiebre de Chikungunya, por consiguiente, el presente estudio desea dar respuesta a la siguiente pregunta: ¿Cuáles son los marcadores de respuesta inmune (citocinas inflamatorias, quimioquinas, factor de crecimiento y coagulación) en pacientes con infección aguda, crónica y fatal por VCHIK en Colombia, durante la epidemia del virus en el 2015?

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Determinar los marcadores de respuesta inmune (citocinas inflamatorias, quimioquinas, factor de crecimiento y coagulación) en pacientes con infección aguda, crónica y fatal por virus del Chikungunya en Colombia, durante la epidemia del virus en el 2015.

2.2 Objetivos específicos

- Estimar las características sociales y demográficas de los pacientes con desenlace fatal y no fatal por FChik durante la epidemia del 2015
- Determinar la diferencia cuantitativa de los niveles de citocinas en pacientes con enfermedad aguda, crónica y fatal por VCHIK.

3. Marco teórico

3.1 Epidemiología

A finales de 1952 y principios de 1953 fue descrito un brote de una enfermedad parecida al dengue, caracterizado por fiebre, cefalea, mialgia, rash y dolor articular, en el sur de Tanganyika (ahora Tanzania), del cual se aisló un virus en la fase aguda de la enfermedad de los pacientes (7). El nombre Chikungunya proviene de una palabra del Kimakonde un lenguaje nativo en Tanzania y Mozambique que significa “el cual se inclina” y se refiere a la postura encorvada que adoptan los individuos infectados por el virus (7). En el Congo, las personas llaman a la enfermedad “buka-buka” que traduce como “quebrado-quebrado”(67).

Posteriormente, dada la incapacidad que genera a los infectados, fue estudiado por laboratorios militares como un arma natural y posible arma biológica (4). Entre 1960 y 1990, se presentaron brotes locales, en numerosos países de África y Asia (5) y había sido considerada una infección benigna auto-limitada a estos continentes, con casos importados por viajeros en países Europeos y Norte América, por esta razón, cobraron una mayor importancia otras arbovirosis como virus del dengue y West Nile virus (WNV) que generaban una alta morbi-mortalidad (5,6,68).

En los últimos 15 años ha habido un incremento en la frecuencia de los brotes, no solo en el hemisferio oriental sino también en el hemisferio occidental, lo cual parece estar asociado a una mayor incidencia de las formas severas de la enfermedad, con compromiso neurológico, hepatitis fulminante y encefalopatía neonatal (64,69). Se podría decir, que la serie de brotes se inició en el 2004 en la isla Lamu, Kenya, con una tasa de ataque que superó el 50% y afectó a más de 13.500 personas (70), luego se extendió a las islas del océano Índico como las islas Comoros (70) e incluso islas como la Réunion (64,69), Mayotte (71), Mauritius (42), Seychelles (72) y Madagascar (73,74).

En el 2006, se originó en la isla La Réunion, uno de los brotes más grandes de la historia del océano Índico (75), afectando 34.5% de la población (266.000 personas), y fue en este brote donde se dieron a conocer las manifestaciones atípicas, fetales y los casos fatales por FChik (75). Entre 2006-2009 se extendió rápidamente a la India, donde produjo más de 1.5 millones de casos (16), luego Sri Lanka (76), Indonesia (77) y Malasia (78), y para el año 2007 se reportaron casos autóctonos en Europa, comenzando por Italia (79).

En diciembre de 2013 se describió el primer caso autóctono de FChik en la Isla francesa Saint Martin, a 150 millas de Puerto Rico (8). Durante los primeros cuatro meses del 2014, más de 31.000 casos autóctonos entre confirmados y probables fueron reportados en las islas del Caribe (80) y en poco tiempo se extendería al continente Americano. Se plantea la hipótesis, que los primeros casos aparecieron a mediados de febrero en la Guyana Francesa, por viajeros que llegaron de las islas (80). El 11 de Julio de 2014, la OPS reportó que habían 355.000 casos entre sospechosos y confirmados de FChik en 20 países de las Américas (9), al finalizar el año, más de 800.000 casos probables y confirmados de FChik habían sido reportados por 30 países del continente y el Caribe (81).

En Brasil, los dos primeros casos autóctonos fueron confirmados el 13 de septiembre de 2014 en el estado de Amapé, y el 18 octubre de 2014 más de 682 casos autóctonos habían sido confirmados y notificados por el Ministerio de Salud (82), ese año se notificaron 3.657 casos sospechosos de FChik (83). En el 2015 y 2016 se notificaron 17.765 casos probables y 277.882 sospechosos autóctonos (83). Para la semana epidemiológica 33 de 2017, se registraron 167.813 casos probables de FChik y 86 óbitos confirmados por VCHIK (84).

En Colombia, el primer caso importado de VCHIK fue confirmado el 19 de Julio de 2014, a partir de una mujer colombiana de 71 años procedente de República Dominicana, a quien se le había hecho diagnóstico clínico en dicho país el 5 de julio. El 11 de septiembre se confirma el primer caso autóctono de FChik en un municipio

de Mahates, Bolívar. Un día después, (12 de septiembre) se confirman 15 casos de FChik, 10 de los cuales fueron en el departamento de Bolívar (2 en Cartagena, 4 Mahates, 4 San Juan Nepomuceno) (85). Sin embargo, cabe destacar que el primer caso fatal confirmado por FChik, tuvo lugar el 9 de septiembre en un paciente masculino de 38 años de edad en el municipio de Mahates, a quien se le tomó muestras de punción cardiaca y de hígado, las cuales fueron reportadas como positivas para VCHIK mediante RT-PCR por el INS el 24 de septiembre de 2014 (85). Al finalizar el año, se habían registrado un total de 106.763 casos, con el mayor número procedentes de la Región Caribe (66.118) (86). En el 2015, se triplicaron los casos reportados en 359.728, de los cuales se confirmaron 54 casos fatales, para una tasa de letalidad de 0.015% (23), los cuales tuvieron una disminución del 95% en el 2016 con 19.566 casos y 8 muertes (24), en el 2017 se notificaron 1.128 casos (25) y hasta la semana epidemiológica 13 del 2018, el INS ha notificado un total de 152 casos sin especificar casos fatales (26).

3.2 El vector

El VCHIK es transmitido y diseminado por mosquitos, en particular las especies *Aedes* (spp.) (81). El virus presenta un ciclo selvático y un ciclo urbano, en Asia el virus se mantiene por un ciclo urbano, es transmitido por el *Ae aegypti* y más recientemente *Ae. Albopictus* (81), mientras que en África involucra un ciclo selvático, principalmente por los mosquitos *Ae furcifer* y *Ae africanus*, pero también incluye *Ae. Aegypti* y *Ae. Lueocephalus* (87).

Los brotes en el Caribe han sido causados principalmente por *Ae. Aegypti* con el genotipo asiático (11), sin embargo, en Brasil la principal transmisión fue dada por el *Ae. Aegypti* con el genotipo VCHIK de África Sur-Central-Oriental (ASCO) (11), y en Panamá la transmisión fue por *Ae. Albopictus* (88). En estados Unidos, el *Ae. albopictus* está presente en las regiones del Sur y Este, por lo que podría ser una amenaza potencial para la diseminación del virus (6,89).

Aunque típicamente el mosquito adquiere el VCHIK tras la picadura de una persona con viremia, la detección del virus en un *pool* de hembras de mosquito sugiere la posibilidad una transmisión vertical (90). Estudios en laboratorio han confirmado que el genotipo ASCO del VCHIK, puede ser transmitido de forma transovárica por el *Ae. Aegypti* (90).

Un alto porcentaje (72-97%) de personas que son infectadas por el VCHIK desarrolla síntomas (29), sin embargo, el mosquito *Aedes*, como en otras arbovirosis no tiene alteración de su capacidad reproductiva, longevidad o signos de infección, aun cuando la carga viral supere 10'000.000 viriones (81). El mosquito presenta por sí mismo un sistema de defensa contra el virus, dado por la respuesta inmune innata, el cual controla la replicación y transmisión del arbovirus (81). En el mosquito la principal defensa está dada por un sistema de ARN de interferencia pequeño de 21 nucleótido (siRNAs, por siglas en inglés small interfering RNAs), el cual inhibe las proteínas no estructurales (nsP) nsP1, nsP3, E1 y E2 del CHIKV (81).

3.3 El Virus del Chikungunya

El virus del Chikungunya causa la fiebre del chikungunya, pertenece a la familia *Togaviridae* y al género alfa-virus el cual está compuesto por 28 virus, se subdivide en dos grupos de acuerdo con la prevalencia de síntomas clínicos en los humanos: El primer grupo está conformado por los virus que causan encefalitis severa y fatal, incluye el virus de la encefalitis venezolana, encefalitis equina del este y encefalitis equina del oeste; y el segundo grupo está conformado por virus artritogénicos, denominados así por el compromiso musculo-articular que generan, incluye entre sus miembros al virus Mayaro (MAYV), virus Río Ross (VRR), virus Sindbis (SINV), virus de la selva Barmah (BFV) y el virus O'nyong-nyong (91–94).

Los virus artritogénicos comparten muchas características entre sí, por ejemplo en la fase aguda de la enfermedad tienen una viremia usualmente entre 5 a 7 días, las manifestaciones clínicas más frecuentes son cefalea, rash, fatiga, artritis, artralgiás, mialgiás y fiebre (95–97). A nivel inmunológico esta fase de la enfermedad ha sido

reconocida por su gran producción de citocinas y quimiocinas debido a la alta carga viral, así como la producción de factores de crecimiento en respuesta a la injuria, la cual es controlada principalmente por IFN α/β y anticuerpos (91,96–98).

El genoma del VCHIK contiene 12.000 nucleótidos lineales, una sola cadena ARN de aproximadamente 12 kb en sentido positivo (81,89), una cápside icosaédrica de 60-70 nm de diámetro con una envoltura de fosfolípido, además codifica 4 proteínas no estructurales y 5 proteínas estructurales a través de dos grandes marcos de lectura abierta (ORF, por siglas en inglés open Reading frames): el ORF1, codifica las proteínas no estructurales (nsP1, nsP2 (helicasa), nsP3 y nsP4 (polimerasa)), mientras que el ORF2 codifica las proteínas estructurales que incluyen: una proteína de la cápside (C), dos glicoproteínas (gp) mayores de superficie (E1, E2) y dos proteínas menores (E3, 6K) (81,89). El genoma tiene una región corta 5' y una región larga 3' ambas sin traducción, ésta última comprende estructuras de tallo-bucle y repeticiones directas que se cree están asociadas con la adaptación del virus al mosquito huésped (99). El VCHIK está organizado como otros alfavirus: 5'-nsP1–nsP2–nsP3–nsP4-región de unión-C–E3–E2–6k–E1-poly (A)-3' con dos ORFs (100). **Anexo Ilustración 1**

Con base en la glicoproteína estructural E1 o en la secuenciación completa del genoma viral, se han determinado 3 distintos grupos filogenéticos: 1. Genotipo de África Sur-Central-Oriental (ASCO), 2. Genotipo Asia, 3. Genotipo África Occidental anteriormente se consideraba de forma independiente un linaje de Océano Índico, sin embargo, análisis filogenéticos han determinado que es una rama del genotipo ASCO (29,87,101). Los brotes reportados en Europa han sido por el genotipo ASCO, mientras que los brotes ocurridos en el hemisferio occidental han sido causados por el genotipo asiático (27,89).

Ciertas mutaciones puntuales en la glicoproteína de envoltura E1 han permitido la expansión del virus a través de brotes, mejorando su capacidad de adaptación y de infección (29,102,103). Por ejemplo, se ha encontrado que el brote de Kenya,

Comoros y Seychelles fue transmitido por *Ae. aegypti* y que el virus tenía un residuo de alanina en la posición 226 del gen E1 (103). Mientras que en escasos o ausencia del *Ae. aegypti* en el caso de la isla La Réunion, el virus presentó una mutación de residuo de alanina a valina (A226V) en el gen E1, lo cual incrementó la replicación viral y la infectividad del virus para una mejor adaptación al *Ae. albopictus*, permitiendo una mejor diseminación, ofreciéndole una ventaja al *Ae. albopictus* sobre el *Ae. aegypti* (29,102,103), lo cual conllevó a una mayor expansión geográfica del virus hacia África Subsahariana, Sureste Asiático y Europa (29). Esta mutación A226V está limitada a la cepa ASCO del VCHIK (81). La mutación en la glicoproteína E1 y E2 permitió una adaptación al genotipo LOI la transmisión en el *Ae. albopictus* (101).

3.3.1 Replicación Viral

El virus entra a la célula diana por medio de endocitosis, proceso dependiente de pH, para lo cual están implicados unos receptores como: DC-SIGN (por sus siglas en inglés dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin 1), L-SIGN (por sus siglas en inglés, liver and lymph node-SIGN), heparan sulfato, laminina e integrinas los cuales interaccionan con la proteína E2 del virus. Luego de la endocitosis, el ambiente ácido del endosoma provoca cambios conformacionales en la envoltura viral que hace que la glicoproteína (gp) E1 se exponga y medie la fusión entre la membrana del virus y la membrana de la célula huésped, esto permite la liberación citoplasmática de la nucleocápside y del genoma viral (29,89,104–106). Posterior a la entrada del virus, se llevan a cabo dos procesos de traducción, uno para las proteínas no estructurales y otro para las estructurales. El ARN genómico en sentido positivo, actúa directamente como un ARNm, el cual inicia el proceso de traducción de dos precursores de proteínas no estructurales, el clivaje de estos precursores genera nsP1-nsP4. La nsP1 está involucrada en la síntesis de la cadena viral negativa de ARN, la nsP2 actúa como ARN helicasa, ARN trifosfatasa y proteinasa y participa en *shut-off* de la transcripción de la célula del huésped, la nsP3 hace

parte de una unidad replicasa y la nsP4 es la ARN polimerasa viral (29,89,104–106).
(Anexo Ilustración 2).

Estas proteínas no estructurales, son responsables de la replicación y formación de una cadena negativa complementaria que sirve de plantilla para la síntesis de cadena positiva, del ARN genómico (49S) y ARN subgenómico (26S), éste último codifica para las 5 proteínas estructurales, primero a través de un precursor (C-pE2-6K-E1) (29). La cápside es liberada, mientras que las gp pE2 y E1 se asocian en el aparato de Golgi y son exportadas a la membrana plasmática, donde la pE2 es escindida en E2 (la cual está implicada en la unión al receptor) y E3, ésta última media la formación de heterodímeros entre E1 y E2 que se trasladan a la membrana plasmática de la célula del huésped, donde se incorporan en la superficie del virión como trímero. El ensamble del virus es promovido por la unión de la nucleocápside al ARN viral, junto con las glicoproteínas de envoltura asociadas a membrana (106). Finalmente, los viriones maduros se ensamblan en la membrana plasmática de la célula y salen de la célula, adquiriendo la membrana de la célula del huésped (65,74,93,100,105).

Después de ser inoculado en el cuerpo, el VCHIK se disemina a los ganglios linfáticos y a la microvasculatura. La primera replicación ocurre en los leucocitos causando leucopenia, otros sitios de replicación primaria son el hígado y el bazo. Después de la primera replicación el virus se disemina a los huesos, músculos y tejido articular, generando un proceso inflamatorio local, que es la fase aguda de la enfermedad (107).

Los fibroblastos y otras células infectadas reconocen el virus por medio de los receptores tipo toll 3, 7 y 8, así como por CARDIF, el cual hace parte de los receptores tipo Rig (RIR), la respuesta inmune conduce a la producción IFN tipo I y posterior producción de anticuerpos, logrando el control de la infección entre 4 a 7 días (106,107).

3.4. Inmuno-patogenicidad del Virus

El virus es inoculado al ser humano a través de la picadura de un mosquito *Aedes* infectado, luego infecta las células de la piel como los queratinocitos, melanocitos, y fibroblastos de la dermis (108). Esta infección inicial, induce una respuesta inflamatoria que coincide con la elevación de los mediadores inflamatorios y las células dendríticas contribuyen a la diseminación hematológica del virus a las articulaciones y tejidos blanco como músculo, hígado y riñón (89,108). **Anexos**

Ilustración 3

El IFN tipo I (IFN- α , IFN- β), es la citocina característica de la respuesta inmune innata de protección en los vertebrados, necesaria para el control de la viremia, al ser la primera línea de defensa contra las infecciones virales (50,65,109,110), con lo cual promueve las funciones de las células asesinas naturales (NK, natural killer por siglas en inglés), linfocitos T y B (49).

Los pacientes con FChik aguda y crónica presentan una alta concentración de citocinas inflamatorias como IFN- α , IFN- γ , IL-6; de citocinas anti-inflamatorias como antagonista del receptor de IL-1, IL-4 e IL-10, y quimioquinas como IP-10 y MCP-1 (47,49,66,110). Usualmente los pacientes infectados por VCHIK desarrollan una fuerte respuesta anticuerpos IgM e IgG neutralizantes para el control de la infección. La IgG neutralizante del VCHIK puede permanecer detectable por al menos 21 meses o por varios años, lo cual podría brindar protección frente a una infección por un nuevo genotipo (47,49,110). Los niveles de IL-18 y de su regulador natural -la proteína de unión a la IL-18, IL-18BP- también fueron estudiados, debido a que la IL-18 incrementa la respuesta Th1, la cual ha demostrado que participa no solo en la inmunidad sino también en la respuesta inflamatoria crónica de la enfermedad, además la IL-18 hace parte de la familia de IL-1 β y es un inductor de IFN- γ (111).

El VCHIK puede infectar y replicarse en células epiteliales, endoteliales y fibroblastos (74,105). Esta replicación viral es citopática y ha sido asociada con una inducción de apoptosis en las células infectadas (74). Los fibroblastos son las

principales células blanco del virus en la fase aguda, afectando en el tejido periférico a: a) tejido conectivo, se detecta en mayor cantidad en epimisio (fascia del músculo) y menor cantidad perimisio y endomisio, b) inserciones tendinosas del músculo, constituidas principalmente por fibroblastos, c) articulaciones, bajo la pared sinuial, sin infectar a los condrocitos, osteoblastos u osteoclastos y d) piel, en la dermis profunda (108,112).

En **la fase aguda** de la enfermedad, diferentes estudios han encontrado elevación de mediadores pro-inflamatorios como interleuquina IL-2R, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, MCP-1, IFN- α , IFN- γ y quimioquinas como IP-10, MIG están elevadas mientras que Eotaxin está suprimida (48,66,110). Al determinar la cinética de las moléculas por día de enfermedad se encontró que desde el *día 1* la IP-10 presentó un máximo pico y luego disminuyó hasta la resolución de los síntomas; entre *día 0 al día 2*: estuvieron elevadas las IL-7, IL-16, IL-17; *día 2 y 3*: SCFG- β ; entre *día 4 al día 7*: IL-6, IL-8, MCP-1, MIF, MIP-1 β , SDF-1 α , IL-1ra, G-CSF, GM-CSF, VEGF e IL-12p40 y entre el *día 0 al día 7*: la IL-2 α , IL-13, IFN- α 2 e IL-4 estuvieron elevadas de forma estable (113). El IFN- α se elevó en todos los pacientes en la primera semana de síntomas, mientras que el IFN- γ en el día 3 (113).

La capacidad de muchos alfavirus para inducir una enfermedad severa es directamente proporcional a su habilidad de evadir o sobrevivir a la inmunidad innata del huésped (113). La IL-6 y MCP-1 han sido asociados con una **alta carga viral** (48,110), un incremento en la IL-1 β y la IL-6, con disminución de los RANTES (CCL5) han sido asociadas con **severidad de la enfermedad** (48) y la persistencia de IL-6 y el factor estimulante de colonia monocito-granulocito (GM-CSF) con las **artralgias persistentes** (48,110). Otros estudios han encontrado niveles significativos de IL-1Ra, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IFN- α (47,65).

Con respecto a la inmunidad adaptativa, se ha encontrado que el virus no puede replicarse en células de la línea linfoide (linfocitos T y B) y células dendríticas derivadas de monocito (74,105). En la inmunidad adaptativa los linfocitos T-CD8

(citotóxicos) juegan un rol importante en la fase aguda de la infección, el predominio de LT-CD8 está asociado con una recuperación rápida y protección, los cuales se activan y proliferan en fases tempranas, al final de la fase aguda se presenta un cambio a LT-CD4 y producción de citocinas inflamatorias IL-1 α e IL-2RA, el predominio de LT-CD4 sobre LT-CD8 está relacionado con formas crónicas de la enfermedad (107,113). Los LT-CD4 han sido detectado en líquido sinovial de pacientes con inflamación crónica (107,114).

El VCHIK, induce una robusta respuesta de anticuerpos IgG, con predominio del isotipo IgG2, estos anticuerpos tienen por objetivo epítomos dentro de la glicoproteína E2 (como E2EP3), E1, cápside y nsp2, lo cual parece ser importante para el aclaramiento de la viremia (105). Sin embargo, se ha encontrado que estos anticuerpos neutralizantes pueden tener reacción cruzada con otros alfavirus como el virus O'Nyong Nyong y el SINV (105). Así mismo, se ha sugerido, que tal como sucede en el dengue, puede estar presente el fenómeno incremento dependiente de anticuerpos (ADE, por siglas en inglés antibody-dependent enhancement) (105).

Los Linfocitos T ayudadores 17 (Th17), han sido detectadas en la fase aguda de la infección por VCHIK, estas células producen IL-17, y han sido implicadas en la patogénesis de otros alfavirus, así como en la artritis reumatoide (109).

3.4.1 Citocinas

Una de las defensas del cuerpo en caso de infección está dada por la participación de citocinas proinflamatorias tales como Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina 1 beta (IL-1 β), la interleucina 12 (IL-12), el interferón- γ (IFN- γ) y, posiblemente. Un exceso de producción se ha correlacionado con el desarrollo de fracaso multiorgánico y con un incremento de la mortalidad (115).

Por otro lado, existe una respuesta inmunoreguladora, las principales citocinas antiinflamatorias son el antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1 ra), el factor transformador del crecimiento beta (TGF- β) y las interleucinas 4, 10, 11 y 13. Los

receptores específicos para la IL-1, el TNF y la IL-18 se comportan como inhibidores de sus respectivas citocinas proinflamatorias. En condiciones fisiológicas, todas estas moléculas sirven como inmunomoduladoras y, por lo tanto, limitan el efecto potencialmente dañino de la reacción inflamatoria. Sin embargo, en condiciones patológicas, la respuesta antiinflamatoria puede ser insuficiente para contrarrestar la actividad inflamatoria o, por el contrario, ser sobrecompensadora e inhibir el sistema inmune y dejar al huésped a merced de la infección (115). La IL-6 es una citocina tanto pro-inflamatoria como anti-inflamatoria de acuerdo con la persistencia del estímulo.

El IFN tipo I: (IFN- α , IFN- β), es la citocina característica de la respuesta inmune innata de protección en los vertebrados, necesaria para el control de la viremia (50,65,109,110). Es producido principalmente por las células dendríticas plasmacitoides (pDC, por siglas en inglés plasmacytoid dendritic cell precursors) que constituyen un subgrupo particular de células dendríticas, pero denominadas *plasmacitoides*, debido a su forma similar con las células plasmáticas productoras de anticuerpos (49,50), además éstas células son insensibles a la replicación del virus (74). Esta característica de las células dendríticas plasmacitoides se debe, en parte, al hecho de que expresan más que otras células receptores endosómicos tipo Toll (TLR 3, 7, 8, 9) (49,50), los cuales se activan con diferentes tipos de ligando, por ejemplo secuencias de CpG oligodeoxinucleótidos (CpG ODNs) son ligando de TLR 9 y la cadena simple de ARN viral es ligando del TLR7 (50). Luego de ser activado por un virus, las pDC producen una gran cantidad de IFN tipo I en las primeras 24 horas, el cual es 100 a 1000 veces más que el producido por otras células sanguíneas (49). La mayor cantidad de IFN- α se produce dentro de las primeras 24 horas después de la estimulación viral, después de este tiempo la producción pasa a ser moderada, debido a que las pDC se vuelven refractarias a estímulos secundarios sea por el mismo u otro virus (49). En cultivos celulares se ha encontrado que el VCHIK es altamente sensible al IFN tipo I y II, por tanto la inmunidad innata es un sistema de control responsable de la disminución rápida de

la viremia durante la fase aguda de la infección, de allí la utilidad de determinar cuáles proteínas inducidas por IFN median la inhibición de la replicación viral, un candidato probable es ISG15 (74). Se ha encontrado que la proteína nsP2 del VCHIK realiza *shut off* de las señales que codifican para IFN tipo I (116).

IL-6: Esta citocina ha sido relacionada con la fase aguda de la enfermedad, así como su persistencia en el tiempo con formas crónicas de artralgias. Los osteoblastos expresan receptores para la IL-6, de tal manera que su infección por el VCHIK conduce a disminución de la osteogénesis con predominio de osteoclastogénesis (117)

3.5 Transmisión materno-fetal

La transmisión madre-hijo es relativamente rara, ya que solo el 2.5% de los neonatos expuestos se infectan (112). Esta transmisión puede ser hasta de un 50% en el periodo intraparto, siendo el punto más crítico de la transmisión en el contexto de viremia materna (112). A diferencia de los otros alfavirus, no se ha demostrado replicación viral en la placenta, lo que la hace una barrera efectiva de la transmisión *ante partum* (112), pues no constituye un blanco privilegiado para el virus, por tanto, se podría decir que al virus del chikungunya “no le gusta la placenta” (108). Investigaciones realizadas en placentas de ratones y humanos mediante inmunohistoquímica (108), no han detectado células infectadas por el virus, soportando la teoría de que el sincitiotrofoblasto humano es refractario a la infección por VCHIK, haciendo de la placenta una barrera efectiva de protección antes del parto (14). La transmisión materno-fetal ocurre alrededor del parto (4 días antes y un días después) (34), la infección se presenta como consecuencia de la transferencia pasiva de sangre materna con partículas del virus, por las brechas fisiológicas de la barrera placentaria, las cuales se incrementan al final del embarazo y en el momento del parto, por las contracciones uterinas (112), la sangre materna tiene en promedio 1.5 millones copias/ml de plasma del virus (14). Además, no se

ha demostrado contaminación neonatal en el canal del parto, por lo que la cesárea no tendría un efecto protector (112).

3.6 Presentación clínica

El periodo de incubación de la FChik es en promedio 4 días con un rango entre 1 a 12 días (10). En la **fase aguda**, los pacientes con FChik, desarrollan fiebre de inicio súbito mayor a 39°C, poli-artralgias severas (87-98%), mialgias (46-59%), rash maculo-papular que compromete más del 90% de la piel, puede ser desde leve a severo, acompañado de prurito generalizado en un 25% de los casos (30,31,69,110). Entre 32-95% de los pacientes desarrollan sinovitis o edema articular (25-42%) y en 15% derrame articular (30,31,110). Los síntomas digestivos pueden estar presente entre 15-47% de los casos como diarrea, náuseas, vómito y dolor abdominal (69).

La **fase crónica (tardía)**, se caracteriza por recaídas impredecibles, sensación de fiebre, astenia y exacerbación de artralgias. Los síntomas más prevalentes son las artralgias o dolores musculoesquelético, estos síntomas parecidos a la artritis son resultado de la respuesta inflamatoria del sistema inmune en el tejido articular donde se replica el virus (107). La duración típica del dolor articular resuelve entre una a tres semanas, sin embargo, un 33% de los pacientes puede persistir con artralgias por 4 meses, 15% por 20 meses y un 12% por 3 a 5 años (107). La persistencia de los síntomas, puede ser debido a la infiltración del tejido articular por macrófagos, resultando en un estado inflamatorio persistente, que induce erosión ósea, que también contribuye con la artritis y artralgia (107).

Existen síntomas menos frecuentes como: lesiones en la piel tipo hipermelanosis, hiperpigmentación, fotosensibilidad, dermatitis exfoliativa, vesículas, vasculitis (69,118), miocarditis, pericarditis (43), nefritis, hepatitis, pancreatitis (45,119).

3.6.1 Manifestaciones en niños

Los neonatos infectados son asintomáticos al nacimiento, y la sintomatología se presenta en promedio entre el día 3 y día 7 de vida (34). Los síntomas clínicos más frecuentes, descritos en varias series de casos fueron fiebre 79%-100%, irritabilidad 100%, dolor articular 94%-100%, rash 58.3%-84% y edema periférico 58%-86% (34,112,120). A diferencia de la trombocitosis reportada por Torres y col (120), otros autores, otros autores han encontrado linfopenia con trombocitopenia (34).

Los niños son considerados un grupo de alto riesgo de manifestaciones atípicas o severas, siendo menos frecuente en ellos las reumatológicas (29); en neonatos y lactantes se ha descrito una alta prevalencia de manifestaciones dermatológicas como hiperpigmentación, eritema generalizado, rash maculopapular y lesiones vesículo-bulosas (dermatitis exfoliativa), igualmente presentan complicaciones neurológicas como encefalitis, convulsiones, síndrome meníngeo o encefalopatía aguda. Se describen síntomas gastrointestinales como deposiciones diarreicas, enterocolitis necrotizante, cianosis periférica y manifestaciones hemorrágicas leves (29,45,118,119). Si la madre se encuentra con una viremia elevada en el momento del parto, hasta un 50%-53% de los neonatos están en riesgo de presentar una enfermedad severa, dada por encefalopatía con discapacidad (14).

3.6.2 Presentación atípica

Los casos atípicos se estiman en una proporción de 0.3% de todos los casos sintomáticos. En una serie de 610 casos atípicos de FChik en la isla La Réunion, 89.5% (546/610) de los pacientes tenían condiciones médicas de base como eventos cardiovasculares, alteraciones neurológicas y enfermedades respiratorias crónicas, 36.3% (222/610) fueron casos severos y 10.6% (65/610) de los pacientes fallecieron (119).

Luego del brote ocurrido en la India, en el 25% de los casos se dieron a conocer manifestaciones del sistema nervioso central (SNC) como convulsiones,

encefalopatía, Guillain-Barré, o hemorragia subaracnoidea (75,103). Esta encefalopatía se caracteriza por ser reversible más que un verdadero proceso encefálico. Se ha observado la presencia del virus a nivel de los plexos coroideos que forman la barrera hemato-encefálica, en la pared ependimal y en células de leptomeninges, éstas últimas son cinco veces más susceptibles a la acción del virus que las demás células, sin embargo, el virus no ha sido detectado ni en el parénquima cerebral ni en las células del endotelio microvascular que constituyen la barrera hemato-encefálica (112).

Un estudio determinó que la infección del SNC en ratones por el genotipo asiático, incrementó la expresión de los genes pro-apoptóticos (eIF2 α K2), mientras que la expresión de los genes anti-apoptóticos (BIRC3), incrementó la respuesta antiviral de protección en el genotipo ASCO (121), por tanto la mortalidad observada por el genotipo asiático fue atribuida a la expresión de los genes involucrados en la respuesta inmune del huésped y no a la replicación del virus en el cerebro (121).

3.7 Factores asociados a severidad y mortalidad por Fiebre de Chikungunya

Distintos factores de riesgo para enfermedad severa y mortalidad han sido investigados (14,48,71,75,89,112,119):

- **Edad:** diferentes estudios han encontrado que grupos de personas en edades extremas de la vida, es decir neonatos y adultos mayores, tienen mayor riesgo para enfermedad severa y mortalidad (108). En un experimento, llevado a cabo con ratones neonatales infectados con el VCHIK en diferentes edades (6, 9 y 12 días de vida), todos los ratones de 6 días de vida desarrollaron parálisis flácida en el día 6 o 7 post-infección y todos fallecieron antes del día 12 post-infección; más de la mitad de los ratones con 9 días de vida se recuperaron de la infección; y ninguno de los ratones con 12 días de vida presentaron infección o murieron por el VCHIK, este estudio demostró que la letalidad asociada a FChik es dependiente de la edad, donde ratones neonatos menores de 12 días presentaron una enfermedad severa por el VCHIK, lo cual podría ser el equivalente de lactantes menores de 1 año en

humanos (108). Igualmente, se ha demostrado que las personas mayores de 85 años tiene RR 3.5, (IC95% 1.6-7.8) morir por FChik (119).

- **Co-morbilidades:** Diferentes estudios han demostrado que las patologías de base, pueden incrementar el riesgo de severidad o mortalidad por VCHIK (119,122). En el brote ocurrido en Guadeloupe, pacientes que presentaron manifestaciones renales, cardíacas, respiratorias y lactato elevado desarrollaron sepsis severa o choque séptico, lo cual incrementó la mortalidad en 48% comparado con 3% ($p < 0.001$) de pacientes sin sepsis (122). Un análisis multivariado de una serie de casos atípicos en FChik encontró que el riesgo de enfermedad severa por hipertensión fue RR 1.7 (IC95% 1.2-2.4), condiciones respiratorias RR 3.1 (2.0-4.9), cardiológicas de base RR 1.6 (IC95% 1.1-2.3) o el consumo de anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) antes de la hospitalización RR 1.8 (1.1-3.0) (119).

- **El Alcohol:** ha sido asociado con mortalidad (14,29,75). En casos atípicos de FChik el abuso del alcohol incrementó la mortalidad RR 1.4 veces (IC95% 4.9-26.5) (119).

- **Co-infección:** Un estudio de casos y controles realizado en pacientes hospitalizados encontró que 25 pacientes tuvieron serología positiva para dengue y VCHIK, y 150 tuvieron mono-infección (96 para dengue y 54 para VCHIK), el 12% de los pacientes con co-infección fallecieron Vs 2% con mono-infección ($p = 0.039$) (36).

- **Género:** No se ha establecido la relación clara con el género, sin embargo, en el brote ocurrido en el Océano Índico se reportaron mayor número de casos en mujeres, sugiriendo una variabilidad de síntomas dependiendo del género (72,103).

- **Marcadores inmunológicos:** elevación de proteína C reactiva, IL-1 β , IL-6, disminución de RANTES (CCL-5) y elevación temprana de IgG3 (69) han sido relacionados con presentación atípica de FChik.

- **Defectos en la vía IFN-I:** defectos parcial o completo en la vía del IFN-I se asocia con el desarrollo de una infección leve o severa (108).

3.7.1 Mortalidad por Chikungunya

Antes del 2006 se habían descrito casos de severidad de FChik como formas hemorrágicas moderadas (123), alteraciones neurológicas (124) y cardiacas como pericarditis y miocarditis (125). El brote ocurrido en la isla La Réunion (75), permitió observar formas severas de la FChik, de 33 pacientes ingresados a la UCI con diagnóstico de FChik, el 42% tuvo manifestaciones de encefalopatía, un caso de miocarditis, hepatitis y Guillain Barré respectivamente y mortalidad de 48% (64). En otra serie de casos, se incluyeron 610 casos atípicos de FChik en la unidad de cuidados intensivos, de los cuales 65 (10.6%) fallecieron (119). De igual manera, estudios epidemiológicos realizados en la India, encontraron un incremento en los casos de defunción durante el brote por VCHIK (exceso de 78, IC99%), comparado con años anteriores (17).

La muerte no es frecuente, y está descrita en 1 por cada 1000 enfermos (119). La mayoría de las defunciones están dadas en neonatos y adultos mayores con patologías de base. En pacientes con infección por VCHIK la causa más común de muerte es falla cardiaca, falla orgánica múltiple, hepatitis y encefalitis (119). En muchos casos la asociación causal directa entre la infección por VCHIK y la muerte no ha sido establecida (69,119). En Colombia, también han sido reportado casos de mortalidad por VCHIK (38). Entre 2014 y 2015, se notificaron 54 casos fatales, para una tasa de letalidad de 0.015% (54/359281) (23) y una mortalidad de 0.128 muertes/100.000 habitantes, en las zonas donde se han reportado casos fatales (43).

3.8 Parámetros de laboratorio

La **fase aguda** de la FChik tiene una duración mediana de 6 días y se presenta con una carga viral elevada (10^7 pfu/ml) (69), acompañado en un 79% de los casos de

linfopenia moderada (<1000 células) y un 21% de linfopenia severa (<500 células/mm³). Un 40-50% de casos presentan trombocitopenia moderada (>100.000 y <150.000 células/mm³) (69). De forma anormal se ha observado en algunos casos, elevación de enzimas hepáticas, anemia y creatinina (29,71,75,89).

Los síntomas de la fase aguda de la enfermedad usualmente desaparecen después de dos semanas, sin embargo la persistencia de artralgias y/o mialgias por semanas, meses o años ya indica un proceso crónico de la enfermedad (126). En este grupo de pacientes se ha observado una persistencia de IL-12, MIG/CXCL-9, IP-10/CXCL-10; títulos de IgG específicos contra VCHIK 6 meses después de la infección, y luego de 10 a 12 meses después de la infección se ha observado circulación de las citocinas Th1: IL-1 β , IL-1RA, IL-6, MCP-1/CCL-2, MIP-1 α /CCL-3, MIP-1 β /CCL-4; y altos niveles de IFN- α (126).

3.9 Definición de caso

3.9.1 Caso de enfermedad por VCHIK

En el 2016, el Instituto Nacional de Salud de Colombia presentó el protocolo de vigilancia en Salud Pública de Chikungunya y de acuerdo con ello define (127):

- *Caso Sospechoso*: Paciente que resida o visite un municipio en donde no se han confirmado casos de chikungunya por laboratorio ubicadas entre 0 y 2200 metros sobre el nivel del mar (msnm), comúnmente denominadas “tierra caliente”, 8 a 15 días antes del inicio de síntomas, que presente fiebre mayor a 38°C, artralgia grave o artritis de comienzo agudo y eritema multiforme o síntomas que no se explican por otras condiciones médicas.

Paciente de grupo de riesgo que proceda de zonas ubicadas entre 0 y 2200 msnm comúnmente denominadas “tierra caliente”, tiene confirmación de circulación viral, 8 a 15 días antes del inicio de síntomas, que presente fiebre mayor a 38°C, artralgia grave o artritis de comienzo agudo y eritema multiforme o síntomas que no se explican por otras condiciones médicas y se le tome muestra.

- *Caso confirmado por clínica:* Paciente que presente que presente fiebre mayor a 38°C, artralgia grave o artritis de comienzo agudo y eritema multiforme o síntomas que no se explican por otras condiciones médicas; que resida o haya visitado un municipio en donde se tenga evidencia de la circulación del virus Chikungunya o esté ubicado en un municipio con radio 30 kilómetros a municipios con circulación viral.
- *Caso confirmado por laboratorio:* Caso sospechoso con alguna de las siguientes pruebas de laboratorio específicas para el virus con resultado positivo (aislamiento viral, RT-PCR, IgM, o aumento de cuatro veces en el título de anticuerpos específicos IgG para virus Chikungunya en muestras pareadas con diferencia de 15 días entre la toma de estas.
- *Caso descartado:* Caso sospechoso al que se le tomó muestras para laboratorio, presentó resultados negativos y se confirma otro diagnóstico.

Por su parte el centro para el control y prevención de enfermedades infecciosas (CDC) y la OPS tienen las siguientes definiciones (128):

- *Caso sospechoso:* paciente con fiebre >38,5°C (101,3°F) y artralgia severa o artritis de comienzo agudo, que no se explican por otras condiciones médicas, y que reside o ha visitado áreas epidémicas o endémicas durante las dos semanas anteriores al inicio de los síntomas.
- *Caso confirmado:* caso sospechoso con cualquiera de las siguientes pruebas específicas para CHIK:
 - Aislamiento viral.
 - Detección de ARN viral por RT-PCR.

- Detección de IgM en una sola muestra de suero (recogida durante la fase aguda o convaleciente).
- Aumento de cuatro veces en el título de anticuerpos específicos para VCHIK (muestras recogidas con al menos dos a tres semanas de diferencia).

La enfermedad crónica se caracteriza por la persistencia de síntomas por más de tres meses y puede durar por años, habitualmente 3 años (128)

“Durante una epidemia, no es necesario someter a todos los pacientes a las pruebas confirmatorias enumeradas anteriormente. El nexo epidemiológico puede ser suficiente”.

3.9.2 Casos fallecidos por VCHIK

Con respecto a los casos de pacientes fallecidos por VCHIK, el Ministerio de Salud en Colombia, el Instituto Nacional en Salud y la Organización Panamericana de la Salud, han definido el proceso de análisis de la muerte con base en la cadena fisiopatológica de los acontecimientos que llevaron al deceso (129). Las dos formas de detección de casos son:

- Reporte al sistema de vigilancia en salud pública: los casos de muerte relacionados con el evento deben ser notificados de manera inmediata y mediante la ficha de notificación al Sistema de Vigilancia en Salud Pública del país, de acuerdo con el flujo de información establecido; es decir, de la Unidad Primaria Generadora de Datos (UPGD), a la Unidad Notificadora Municipal (UNM); de esta, a la Unidad Notificadora Departamental (UND) y luego, al Instituto Nacional de Salud (INS); así mismo estas instituciones deben asegurarse del envío de las muestras necesarias para los análisis virológicos y patológicos (muestras de tejidos de corazón, pulmón, bazo, riñón, cerebro, hígado y piel) ya que son vitales en la configuración de caso (129).

- Búsqueda activa de casos: Teniendo en cuenta el listado de diagnósticos diferenciales, las Unidades Primarias Generadoras de Datos deberán realizar una búsqueda mensual de muertes con el objeto de verificar la probabilidad de que estos estén relacionados con Chikungunya. En caso de que dicha sospecha no sea descartada, deberá ser notificado como caso sospechoso de muerte por Chikungunya y seguir todo el proceso establecido para estos casos.

De igual forma, se puede hacer búsqueda activa de los casos mediante la revisión de los resultados del laboratorio de referencia tanto del Instituto Nacional de Salud como de los departamentos.

Para el análisis de los casos, la información requerida es: historia clínica completa del caso, ficha de notificación en el sistema de vigilancia en salud, certificado de defunción, resultados de pruebas específicas (búsqueda de antígenos en sangre y tejidos, detección de anticuerpos específicos y resultados de patología), autopsia verbal que se desarrollará mediante entrevista semiestructurada con los familiares del caso.

Luego de obtenida la información se conforma un comité de análisis quienes determinarán la clasificación final (129):

- *Relación directa con el VCHIK:* Caso de muerte que presentó cuadro clínico con sintomatología compatible con enfermedad por el virus Chikungunya, el cual empezó en los 10 días previos al inicio del deterioro clínico, con confirmación por laboratorio de la presencia del virus Chikungunya (PCR o IgM o inmunohistoquímica) en sangre o tejido, y la muerte es resultado de una complicación grave de la forma sintomática y atípica del Chikungunya.
- *Relación indirecta con el VCHIK:* Caso de muerte que presentó cuadro clínico con sintomatología compatible con enfermedad por el virus del Chikungunya, el cual empezó en los 10 días previos al inicio del deterioro clínico, con confirmación por laboratorio de la presencia del virus del Chikungunya (PCR

o IgM o inmunohistoquímica) en sangre o tejido y cuya causa básica de muerte no es el Chikungunya sino otro estado patológico bien sea preexistente o no, pero en la que el Chikungunya es contribuyente.

- *Descartada*: Caso de muerte que presentó cuadro clínico con sintomatología compatible con enfermedad por el virus del Chikungunya que cumple con uno o más de los siguientes criterios:
 - Inició por lo menos 28 días antes de la muerte
 - Resultados de exámenes de laboratorio negativos para la presencia del virus del Chikungunya (PCR o IgM o inmunohistoquímica) en sangre o tejido.
 - La muerte es el resultado de una complicación de otro estado mórbido o trauma en el que el Chikungunya no es contribuyente.

3.10 Diagnóstico

El diagnóstico está basado en tres parámetros:

- Clínicos,
- Epidemiológicos y
- Laboratorio.

El diagnóstico clínico se basa en el cumplimiento de la definición de caso, establecida a nivel mundial por la CDC y OPS (128), y a nivel nacional por el INS (130). Se ha comprobado el alto valor diagnóstico que tiene la asociación de fiebre y poliartralgia tuvo una sensibilidad de 84% (IC95% 79-87), especificidad de 89% (IC95% 86-91), valor predictivo positivo 87% (IC95% 85-89) (71).

El diagnóstico epidemiológico está basado en los antecedentes de exposición del paciente, por lo que la FChik debe sospecharse en caso de residir o haber visitado zonas epidémicas, en las que se ha informado transmisión 15 días antes de la aparición de los síntomas. Por ejemplo, el 12 de septiembre de 2014 fueron confirmados 10 casos de FChik por RT-PCR en el departamento de Bolívar, por lo

cual los casos notificados posterior a esa fecha, se clasificaron como confirmados por clínica siempre que cumplan la definición de caso (85).

La confirmación de la enfermedad por laboratorio, puede ser por a) detección del virus, b) detección del ARN viral mediante RT-PCR, c) anticuerpos específicos contra el VCHIK (131).

- a) El aislamiento del virus es posible realizarlo en los primeros 7 días de la infección (131). El suero obtenido de la sangre total extraída durante la primera semana de la enfermedad y transportada al laboratorio en frío (entre 2°–8°C o hielo seco) lo más rápidamente posible (≤ 48 horas) se puede inocular en una línea celular susceptible o en ratón lactante, el VCHIK producirá los efectos citopáticos típicos (ECP) dentro de los tres días posteriores a su inoculación en una variedad de líneas celulares, que incluyen células Vero, BHK-21 y HeLa (128). El aislamiento del virus puede realizarse en frascos de cultivo T-25 o viales Shell (128). El aislamiento del VCHIK debe confirmarse ya sea por inmunofluorescencia (IF) usando antisuero específico para VCHIK, o por RT-PCR del sobrenadante del cultivo o suspensión de cerebro de ratón. El aislamiento del virus sólo debe realizarse en laboratorios con nivel de bioseguridad 3 (BSL-3) para reducir el riesgo de transmisión viral (128).
- b) El ARN viral es detectado por unos pocos días adicionales con el uso de RT-PCR en tiempo real (131). Puede detectar el ácido nucleico del virus desde el primer día de inicio de los síntomas hasta el séptimo día (29)
- c) El suero obtenido de sangre total en la prueba de inmunoabsorción enzimática (ELISA) y en la prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT). La muestra de suero (o sangre) debe ser transportada a 2°–8°C, sin congelar. El diagnóstico serológico puede hacerse por demostración de anticuerpos IgM específicos para VCHIK o por un aumento de cuatro veces

en el título de PRNT entre muestras de fase aguda y fase convaleciente. La determinación de anticuerpos IgM específicos para VCHIK se realiza mediante ELISA de captura del anticuerpo IgM (MAC-ELISA) (128,131).

3.11 Manejo

El manejo de la FChik es sintomático y de soporte. Se debe administrar adecuada infusión de líquidos, y para el alivio de los síntomas se debe usar acetaminofen o AINES, evitando el uso de la aspirina debido a la inhibición plaquetaria. Otras medidas como uso de cloroquina, corticoesteroides, antibióticos o antivirales (como ribavirina o interferon) no han mostrado beneficios (43,69,89,122,128,132).

En cuanto al manejo de los síntomas crónicos, la sociedad de Reumatología de Brasil ha presentado las recomendaciones para el tratamiento de paciente con FChik, sugiriendo que pacientes en esta fase de la enfermedad pueden utilizar analgésicos tipo AINES para el alivio de los síntomas y en caso de dolor severo o refractario al manejo pueden ser usados opioides débiles como codeína y tramadol (133). Así mismo, los corticoides orales en dosis bajas (5-20mg/día prednisona o prednisolona) pueden ser usados para molestias musculoesqueléticas y neuropáticas por 6 a 8 semanas, y retirando de forma lenta y gradual debido al riesgo de recurrencia de los síntomas (133). De igual manera, medicamentos antimaláricos como la hidroxicloroquina solos o en combinación con metotrexate (dosis 10-25mg/semanal) o sulfazalacina en caso de contraindicación o falla de metotrexate (2-3gr/día) (133).

Las medidas de rehabilitación deben hacerse en todas las fases y evitar el calor, y se debe educar al paciente realizar ejercicios; en la fase subaguda y crónica, además de lo anterior se recomiendan ejercicios aeróbicos activos de resistencia y propiocepción (133).

3.12 Vacunas

Aun no existen vacunas licenciadas o medicamentos antivirales contra el VCHIK. La primera vacuna desarrollada en preparaciones del virus inactivada con formalina y cepas atenuadas, pero no tuvieron éxito (134). Otras investigaciones, tienen por objetivo partículas virales que codifican para la capsula y la envoltura induciendo altas concentraciones de anticuerpos protectores neutralizantes (135). En la actualidad varias vacunas se encuentran en fase pre-clínica (89).

4. Metodología

4.1 Tipo de estudio

Este trabajo de investigación se desarrolló bajo la metodología de un estudio observacional descriptivo transversal.

4.1.2 Población de estudio

4.1.2.1 Población Diana:

Pacientes notificados al INS como casos de enfermedad aguda, crónica y fatal por virus de chikungunya.

4.1.2.2 Población Accesible:

Pacientes notificados al INS como casos de enfermedad aguda, crónica y fatal por virus de chikungunya en el año 2015.

4.1.2.3 Población Elegible:

Pacientes notificados al INS como casos de enfermedad aguda, crónica y fatal por virus de chikungunya en el año 2015; y que además se conserve muestra serológica, de líquido cefalorraquídeo o de tejido suficiente que permita procesar para detección de citocinas en el laboratorio.

4.1.3 Definición de casos

4.1.3.1 Caso de enfermedad aguda no fatal (EANF) por VChik

Caso confirmado por laboratorio de FChik sin manifestaciones graves o atípicas de infección por el VCHIK

4.1.3.2 Caso de enfermedad aguda fatal (EAF) por VChik

Caso confirmado por laboratorio de FChik, con cuadro clínico con sintomatología compatible con enfermedad por el VCHIK, el cual empezó en los 10 días previos al inicio del deterioro clínico, siendo la muerte el resultado de una complicación grave de la forma sintomática y atípica de la infección VCHIK.

4.1.3.3 Caso de enfermedad crónica (EC) por VChik

Caso confirmado por laboratorio de FChik con persistencia de síntomas por más de tres meses

4.1.4 Origen de las muestras

Del banco de muestras presentes en el laboratorio de arbovirus del INS, fueron seleccionadas de forma aleatoria las muestras de pacientes con EANF y EAF que tuviera al menos 2ml de suero para el análisis posterior.

Las muestras de pacientes con enfermedad crónica por VCHIK, fueron obtenidas de la base de datos de la cohorte de seguimiento realizada por el INS en el corregimiento de San Joaquín (Mahates – Bolívar) lugar donde fue detectada por primera vez la transmisión autóctona del VCHIK en el país. La base de datos ha sido alimentada en las visitas realizadas por la Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública del INS, desde la detección de la circulación autóctona del VCHIK en septiembre de 2014 hasta la evolución de los casos a fase crónica de la enfermedad. Al inicio de la cohorte se detectaron 576 casos agudos, de estos casos 380 pasaron a fase subaguda y luego 99 pacientes pasaron a fase crónica. En el presente estudio, se analizó los pacientes con enfermedad crónica incluidos en la base de datos entre 1ero de enero de 2015 a 31 de diciembre de 2015.

4.1.5 Criterios de inclusión

Todas las muestras procedentes de pacientes clasificados como casos confirmados por laboratorio con enfermedad aguda, crónica o fallecido con relación directa o indirecta por el VCHIK

4.1.4 Criterios de exclusión

1. Pacientes con diagnóstico clínico confirmado de inmunosupresión (VIH/SIDA, quimioterapia, neoplasias hematológicas o sólidas, consumo de inmunosupresores, y desnutrición)

2. Niños pretérminos.
3. Co-infección con virus del dengue, zika o bacterias

4.2 Tamaño de la muestra

La muestra obtenida es a conveniencia, ya que se tomaron todos los casos fatales de FChik notificados al INS; los casos con EANF fueron seleccionados del banco de muestras del laboratorio de arbovirus del INS y los casos con enfermedad crónica fueron obtenidos de la base de datos de la cohorte de seguimiento realizada por el INS en el corregimiento de San Joaquín, de aquellos pacientes incluidos desde 1 de enero de 2015 a 31 de diciembre de 2015.

4.3 Variables

Se establecieron las siguientes macrovariables y variables (**Tabla 1** y **Tabla 7 anexo**):

Tabla 1. Macrovariables y variables

MACROVARIABLES	VARIABLES
Características sociodemográficas	Edad, sexo, ciudad y departamento de ocurrencia,
Características epidemiológicas	Clasificación de caso de enfermedad por VCHIK, condición final,
Características clínicas	día de la enfermedad en que se toma la muestra
Marcadores inmunológicos	Citocinas y quimiocinas pro y anti-inflamatorias

Previo al proceso de ejecución del proyecto, se solicitó permiso a las autoridades del Instituto Nacional de Salud y al comité de ética de la Universidad del Norte. Se efectuó la presentación del proyecto y de las personas que ayudarían en la ejecución del mismo.

La fuente de información de los casos es secundaria, a partir de la información brindada por la ficha epidemiológica de notificación obligatoria por cada caso del INS.

4.4. Control de sesgos

- Sesgos de selección: para evitar este tipo de sesgos las muestras de pacientes con EANF y EAF fueron seleccionadas de forma aleatoria del banco de muestras presentes en el laboratorio de arbovirus del INS, con al menos 2ml de suero para el análisis posterior.

Y para las muestras de pacientes con EC por VCHIK, fueron obtenidas de la base de datos de la cohorte de seguimiento realizada por el INS en el corregimiento de San Joaquín (Mahates – Bolívar) lugar donde fue detectada por primera vez la transmisión autóctona del VCHIK en el país. La base de datos ha sido alimentada en las visitas realizadas por la Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública del INS, desde la detección de la circulación autóctona del VCHIK en septiembre de 2014 hasta la evolución de los casos a fase crónica de la enfermedad. Al inicio de la cohorte se detectaron 576 casos agudos, de estos casos 380 pasaron a fase subaguda y luego 99 pacientes pasaron a fase crónica. Los pacientes incluidos en el presente estudio, fueron aquellos que ingresaron a la base de datos desde el 1ero de enero de 2015 al 31 de diciembre de 2015.

- Sesgo de información: debido a que la fuente de información fue secundaria, se descartaron las muestras de pacientes con fichas epidemiológicas incompletas.

5. Plan de recolección de datos

5.1 Selección de muestras

La identificación de la población elegible se realizó mediante la información disponible de fuente secundaria a partir del SIVIGILA, las unidades de análisis de mortalidad por el VCHIK y el registro del Laboratorio de Arbovirus del INS. Una vez identificados el total de los casos fallecidos que cumplieron con la definición de caso se procedió a determinar si había la cantidad de suero suficiente para la realización del análisis de laboratorio. Para los pacientes con EANF, se tomó el listado de pacientes con muestras de suero aptas para análisis que fueron enviadas al laboratorio de arbovirus del INS entre el 1ero de enero de 2015 a diciembre 31 de 2015, seleccionando de manera aleatoria 2 pacientes con EANF para cada caso fatal. Las variables sociodemográficas, clínicas y de laboratorio se obtuvieron de los formularios de notificación disponibles en el Instituto Nacional de Salud. Las muestras de pacientes con enfermedad crónica por VCHIK, fueron obtenidas de la base de datos de la cohorte de seguimiento realizada por el INS en el corregimiento de San Joaquín, de aquellos pacientes incluidos desde 1 de enero de 2015 a 31 de diciembre de 2015.

5.2 Pruebas moleculares

Las muestras de los pacientes, previa al análisis de biomarcadores tuvieron una prueba positiva para qRT-PCR o IgM, en el laboratorio de arbovirus del INS, de acuerdo al protocolo del investigador Robert Lanciotti y colaboradores, la cual ha demostrado una sensibilidad analítica de 25 copias genómicas/reacción.

5.2.1 Análisis de biomarcadores

En el presente estudio, se utilizaron los kits (HCYTOMAG-60K y HCVD1MAG-67K) por conveniencia, los cuales cumplen los estándares de otros disponibles en el mercado como el *Human inflammatory cytokines kit* (136), *DuoSeT ELISA Development kit (R&D Systems Inc, USA)* (137), *Bio-Rad kit* (138). Los kits implementados en el presente estudio, consisten en un conjunto de microesferas

teñidas de tinte fluorescente, que se revisten con un anticuerpo específico para una citocina, quimioquina o biomarcador que permite la captura y detección de analitos específicos de una muestra. Dentro del analizador Luminex compacto, los láseres excitan los colorantes internos que identificó cada partícula de microesferas, y también cualquier colorante informador capturado durante el ensayo. De esta manera, la tecnología xMAP permitió la detección de múltiples analitos dentro de una sola muestra de pequeño volumen, con mayor rapidez y precisión. El kit MILLIPLEX para Luminex en sangre, permite analizar el perfil de 13 citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento. Los kits fueron manipulados y procesados según las recomendaciones del fabricante. El análisis de los biomarcadores se realizó en las instalaciones de laboratorio de la Universidad del Norte por la presencia de equipo y personal con experiencia para el procesamiento de las muestras e interpretación de los resultados.

Se consideraron como valores normales de referencia para las interleucinas (pg/mL)

Citocinas	Valor referencia
IL-2	<30.6
IL-4	<15.43
IL-5	<6.26
IL-6	<6
IL-10	<3.62
IL-12p70	<131.81
GM-CSF	<11.85
IFN- γ	< 20
LT-alpha/TNF-beta	<6.21
TNF-alpha	<8.89

6. Aspectos éticos

Este estudio se consideró sin riesgo, se siguieron estrictamente las normas internacionales para investigación con humanos y en especial las consignadas en la declaración de Helsinki (2000) y de la resolución N°008430 de 1993 del ministerio de la Protección Social en la cual se establecen las normas técnicas, científicas y administrativas para la investigación en humanos. Se garantizó la confidencialidad de las personas incluidas y se les informó sobre el propósito y el objetivo de la investigación. Igualmente, este proyecto cuenta con el aval del comité de ética de la Universidad del Norte y del INS.

7. Plan de procesamiento

Los instrumentos diligenciados fueron revisados, y los que estuvieron diligenciados de forma incompleta o incorrecta se eliminaron. Los formularios tramitados de manera completa, se digitalizaron y tabularon se creó una base de datos en Microsoft Excel 2007©, se codificaron las variables cualitativas para un manejo más ágil. La base de datos, se exporto para la presentación y el análisis a los paquetes estadísticos: IBM SPSS Statistics 22 y Epi-Info 7.

Las características de la población se presentan en tablas de frecuencia. Los niveles de medición de las citocinas, quimiocinas y demás marcadores inflamatorios se presentan en tablas clasificando los grupos de acuerdo a la condición final del paciente hallándose el valor de la mediana, para establecer comparaciones entre los grupos.

Los datos de naturaleza categórica se expresan en frecuencias absolutas, porcentajes con sus intervalos de confianza del 95%.

Para variables cuantitativas inicialmente se probó la normalidad de los datos de cada variable mediante los gráficos Q-Q y la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y se identificó la presencia de datos atípicos y la simetría de estos mediante

los gráficos de cajas y bigotes. Y posteriormente fueron categorizados. Los datos continuos se muestran en mediana (Me) de acuerdo a la presencia de datos atípicos y su distribución asimétrica, con su respectivo intervalo de confianza 95% y promedios. Las medidas de dispersión fueron rango intercuartílico (RI) y desviación estándar (DE). Las diferencias de las medianas fueron calculadas con la prueba de Mann Whitney. Un valor de $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

8. Resultados

Entre el 1ero de enero y el 31 de diciembre del año 2015 un total de 19.566 casos de chikungunya fueron notificados al INS, de los cuales 209 (1.1%) fueron confirmados por laboratorio y el resto por clínica. En el presente estudio se incluyeron un total de 164 (78.46%) muestras serológicas de pacientes que cumplieron los criterios de inclusión y exclusión, 50 pertenecieron a pacientes con enfermedad aguda no fatal, 25 fueron casos confirmados que fallecieron por causa directa o indirecta por el VCHIK y 89 de pacientes con enfermedad crónica.

Las muestras fueron tomadas entre los días 2 y 32 de la enfermedad para los casos agudos, y después de los 12 meses para los casos crónicos. La mediana de tiempo de la toma de muestra fue de 4.5 [RIQ 3] días para los pacientes con enfermedad aguda no fatal y de 7 [RIQ 1.75] días para los pacientes que fallecieron, con una diferencia estadísticamente significativa (p 0.0002). El promedio de edad para la población total fue de 48.2 años \pm 24.4 DE, 59.8% (98/164) eran de sexo femenino. Del total de mujeres 28.5% (28/98) tuvieron EANF, 8.1% (8/98) EAF y 63.2% (62/98) tuvieron EC. Del total de hombres (66/164), 33.3% (22/66) tuvieron EANF, 25.7% (17/66) EAF y 40.9% (27/66) tuvieron EC.

Los pacientes con **enfermedad aguda** tenían una edad promedio de 49.6 años \pm 32.1 DE; siendo el subgrupo etario de 0-10 años el que mayor número de pacientes reportó 20.8% (10/50), seguido de los subgrupos 61-70 años, 71-80 años y >80 años con 16.7% cada uno. Los pacientes con **enfermedad aguda fatal** tuvieron un promedio de edad de 48.2 años \pm 32.3 DE; donde los grupos de 0-10 años y 71-80 años reportaron 24% (6/25) de los casos cada uno. Al comparar los dos grupos de pacientes, se encontró diferencias significativas (p 0.04) en la presentación por sexo, siendo el mayor número de casos fatales (68.0%) en hombres, pero al comparar los subgrupos etarios no hubo diferencias significativas **Tabla 2**.

De acuerdo al lugar de procedencia, las muestras analizadas fueron enviados de 13 departamentos de Colombia, donde el Tolima fue el departamento que mayor

número de muestras de pacientes con EANF y EAF aportó (17 y 8 respectivamente).

Tabla 2

Tabla 2. Variables sociodemográficas pacientes con FChik aguda no fatal Vs fatal

Variable		Agudo n=50 N (%) [IC95%]	Fallecidos n=25 N (%) [IC95%]	Valor de P
Sexo	Femenino	28 (56.0) [41.3-70.0]	8 (32.0) [14.9-53.5]	0.04*
	Masculino	22 (44.0) [30.0-58.7]	17 (68.0) [46.5-85.1]	
Edad	X ± DE	49,6 ± 32.1	48,2 ± 32,3	0.85
Toma de muestra	Mediana tiempo [RIQ]	4.5 [3]	7 [1.75]	0.0002*
Rango Etario	0-10 años	10 (20.8) [10.5-35.0]	6 (24.0) [9.4-45.1]	0.75
	11-20 años	5 (10.4) [3.5-22.7]	2 (8.0) [1.0-26.0]	0.73
	21-30 años	2 (4.2) [0.5-14.3]	1 (4.0) [0.1-20.4]	0.96
	31-40 años	4 (8.3) [2.3-20.0]	0 (0.0)	0.14
	41-50 años	4 (8.3) [2.3-20.0]	2 (8.0) [1.0-26.0]	0.96
	51-60 años	1 (2.1) [0.1-11.1]	1 (4.0) [0.1-20.4]	0.61
	61-70 años	8 (16.7) [7.5-30.2]	4 (16.0) [4.5-36.1]	0.93
	71-80 años	8 (16.7) [7.5-30.2]	6 (24.0) [9.4-45.1]	0.44
>80 años	8 (16.7) [7.5-30.2]	3 (12.9) [2.5-31.2]	0.66	
Procedencia	Bolívar	0	1 (4.0) [0.1-20.4]	0.15
	Boyacá	1 (2.0) [0.1-10.6]	0	0.15
	Casanare	1 (2.0) [0.1-10.6]	0	0.15
	Cundinamarca	14 (28.0) [16.2-42.5]	6 (24.0) [9.4-45.1]	0.71
	Guaviare	1 (2.0) [0.1-10.6]	0	0.15
	Huila	0	2 (8.0) [1.0-26.0]	0.04
	La Guajira	3 (6.0) [1.3-16.5]	1 (4.0) [0.1-20.4]	0.71
	Nariño	2 (4.0) [0.5-13.7]	1 (4.0) [0.1-20.4]	1.0
	Norte de Santander	8 (16.0) [7.2-29.1]	4 (16.0) [4.5-36.1]	1.0
	Risaralda	1 (2.0) [0.1-10.6]	0	0.15
	Sucre	0	1 (4.0) [0.1-20.4]	0.15
	Tolima	17 (34.0) [21.2-48.8]	8 (32.0) [14.9-53.5]	0.86
Valle del Cauca	2 (4.0) [0.5-13.7]	1 (4.0) [0.1-20.4]	1.0	

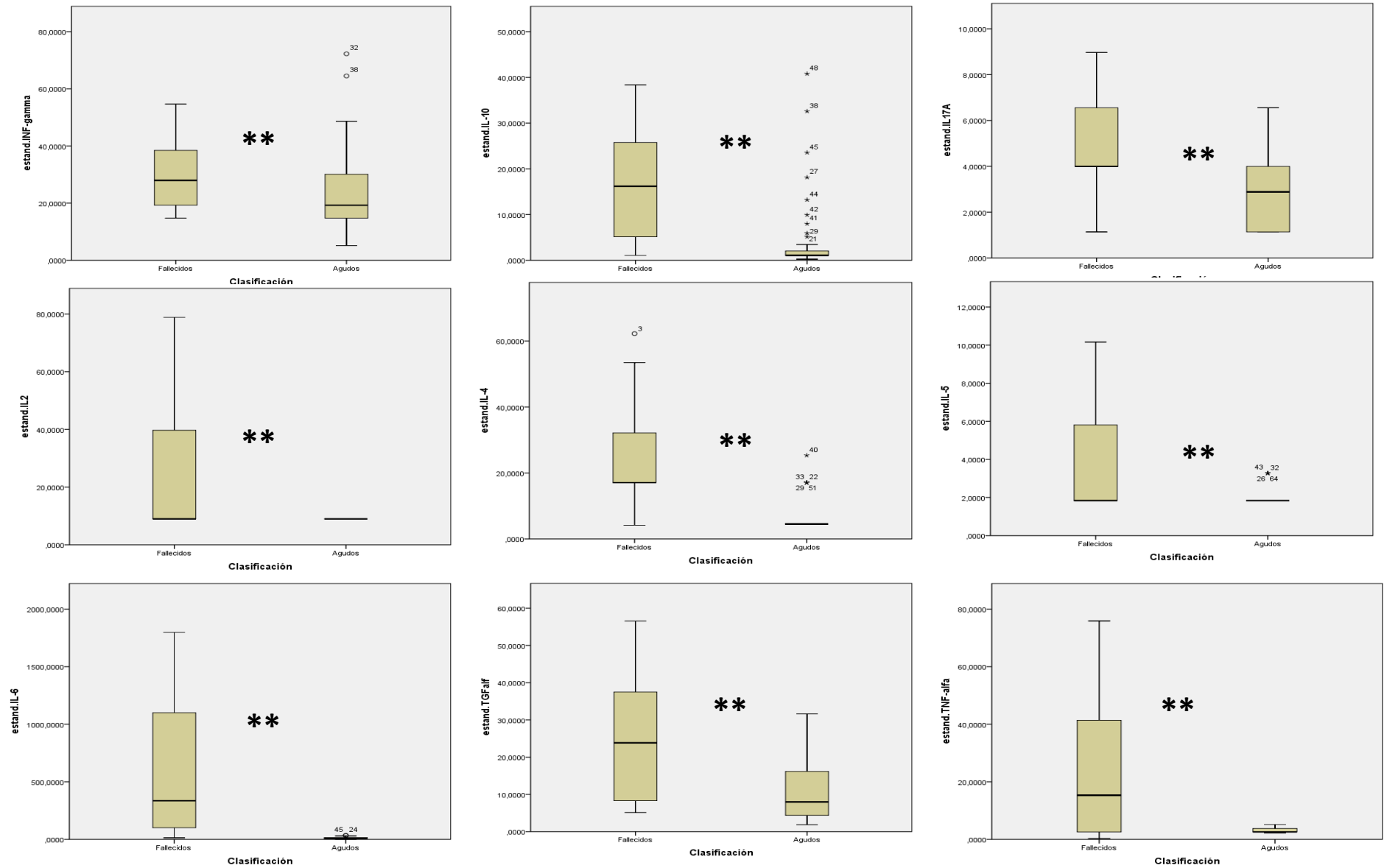
La **Tabla 3**, presenta la mediana de niveles de citocinas cuantificadas en pacientes con enfermedad aguda quienes no tuvieron complicaciones, requerimiento de UCI ni desenlace fatal; comparado con los pacientes fallecidos por FChik. Diez citocinas plasmáticas (IFN-gamma, IL-10, IL-13, IL-17a, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TGF- α , TNF- α) estuvieron significativas elevadas en los pacientes fallecidos comparado con los pacientes con infección aguda ($p < 0.005$). Entre todas las citocinas proinflamatorias de pacientes con EAF, la IL-6 tuvo el valor de mediana más alto de 717.82 pg/ml [RIQ 10891.11], comparado con los pacientes con infección aguda, quienes tuvieron mediana de 12.30 pg/ml [RIQ 203.64]. Entre las citocinas anti-inflamatorias, la IL-10 fue encontrada significativamente mayor en los pacientes con desenlace fatal (Me 19.44 pg/ml) [RIQ 878.93], comparado con pacientes con EANF (Me 1.06 pg/ml) [RIQ 74.95]. La concentración plasmática de GM-CSF, IL-12, LT-alpha/TNF-b fue igual para ambos grupos de pacientes ($p > 0.5$).

Tabla 3. Comparación de citocinas en pacientes agudos y fallecidos por VCHIK

Variables	Agudos n=50				Fallecidos n=25				Diferencia de medianas U de Mann whitney Valor de p
	Me	RI	Min	Máx	Me	RI	Min	Máx	
pg/ml									
GM-CSF	3.47	3.24	0.56	3.81	3.47	2879.43	0.56	2880	0.165
IFN-gamma	23.66	3058.49	5.14	3063	35.36	534.70	14.75	549.45	0.004
IL-10	1.06	74.95	0.23	75.18	19.44	878.93	1.06	880	0.000
IL-12	38.60	12.72	25.87	38.60	38.60	203.06	25.87	228.93	0.546
IL-13	133.21	137.79	121.55	259.35	133.21	3547.08	133.21	3680	0.000
IL-17a	2.88	12.41	1.13	13.55	3.99	64.55	1.13	65.69	0.000
IL-2	8.96	61.42	8.96	70.39	8.96	241.41	8.96	250.38	0.001
IL-4	4.51	27.63	4.51	32.15	32.15	223.50	4.16	227.66	0.000
IL-5	1.83	3.97	1.83	5.81	2.55	17.08	1.83	18.91	0.000
IL-6	12.30	203.64	0.58	204.22	717.82	10891.11	13.70	10904	0.000
LT-alpha/TNF-b	1.81	6.67	1.81	8.49	1.81	19.91	1.81	21.73	0.214
TGF-alpha	9.96	1379.00	1.87	1380	27.13	116.79	5.11	121.90	0.005
TNF-alpha	2.60	16.99	0.31	17.31	36.95	874.56	0.31	874.88	0.000

En el **gráfico 1**, se observa gráficamente las diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de citocinas de pacientes que fallecieron por FChik comparado con aquellos que tuvieron enfermedad aguda.

Gráfico 1. Comparación de citocinas pacientes con enfermedad aguda Vs fatal



** Diferencias significativas, comparación de medianas U Mann-Whitney

Los pacientes con **enfermedad crónica** tuvieron en promedio 47.5 años \pm 15.7 DE, estando el 24.7% de los pacientes entre 31 y 40 años, seguido de los grupos 41-50 y 51-60 años con 21.3% cada uno. Al comparar el grupo de pacientes que tuvo EANF con el grupo de pacientes con EC, no hubo diferencias significativas en la distribución por sexo, pero si en los subgrupos de edades: La forma aguda de la enfermedad fue más prevalente en las edades extremas de la vida (<10 años y >70 años), mientras que la forma de presentación crónica en los adultos jóvenes y adultez intermedia (20-60 años), siendo significativas estas diferencias ($p < 0.05$). El 100% de las muestras de pacientes con enfermedad crónica provenían del departamento de Bolívar y el 34.0% de las muestras de pacientes con EANF fueron enviadas desde el departamento de Tolima, seguido de Cundinamarca 28.0%.

Tabla 4

Tabla 4. Variables sociodemográficas pacientes con FChik aguda Vs crónica

Variable		Agudo n=50 N (%) [IC95%]	Crónico n=89 N (%) [IC95%]	Valor de P
Sexo	Femenino	28 (56.0) [41.3-70.0]	62 (69.7) [59.0-79.0]	0.10
	Masculino	22 (44.0) [30.0-58.7]	27 (30.3) [21.0-41.0]	0.10
Edad	X \pm DE	49,6 \pm 32.1	47,5 \pm 15,7	0.60
Rango Etario	0-10 años	10 (20.8) [10.5-35.0]	0 (0.0) [0.0-4.1]	0.001*
	11-20 años	5 (10.4) [3.5-22.7]	2 (2.2) [0.3-7.9]	0.03*
	21-30 años	2 (4.2) [0.5-14.3]	9 (10.1) [4.7-18.3]	0.01*
	31-40 años	4 (8.3) [2.3-20.0]	22 (24.7) [16.2-35.0]	0.10
	41-50 años	4 (8.3) [2.3-20.0]	19 (21.3) [13.4-31.3]	0.04*
	51-60 años	1 (2.1) [0.1-11.1]	19 (21.3) [13.4-31.3]	0.001*
	61-70 años	8 (16.7) [7.5-30.2]	11 (12.4) [6.3-21.0]	0.48
	71-80 años	8 (16.7) [7.5-30.2]	5 (5.6) [1.8-12.6]	0.03*
	>80 años	8 (16.7) [7.5-30.2]	2 (2.2) [0.3-7.9]	0.001*
	Bolívar	0	89 (100) [100]	0.0*
	Boyacá	1 (2.0) [0.1-10.6]	0 (0.0) [0.0-4.1]	0.18
	Casanare	1 (2.0) [0.1-10.6]	0 (0.0) [0.0-4.1]	0.18

Procedencia	Cundinamarca	14 (28.0) [16.2-42.5]	0 (0.0) [0.0-4.1]	0.000*
	Guaviare	1 (2.0) [0.1-10.6]	0 (0.0) [0.0-4.1]	0.18
	Huila	0	0 (0.0) [0.0-4.1]	1.0
	La Guajira	3 (6.0) [1.3-16.5]	0 (0.0) [0.0-4.1]	0.01*
	Nariño	2 (4.0) [0.5-13.7]	0 (0.0) [0.0-4.1]	0.05
	Norte de Santander	8 (16.0) [7.2-29.1]	0 (0.0) [0.0-4.1]	0.000*
	Risaralda	1 (2.0) [0.1-10.6]	0 (0.0) [0.0-4.1]	0.18
	Sucre	0	0 (0.0) [0.0-4.1]	1.00
	Tolima	17 (34.0) [21.2-48.8]	0 (0.0) [0.0-4.1]	0.00
	Valle del Cauca	2 (4.0) [0.5-13.7]	0	

En la **Tabla 5**, se muestra una comparación entre los niveles de citocinas obtenidos de pacientes en la fase aguda de la enfermedad sin desenlace fatal y pacientes que cumplieron criterios de enfermedad crónica por Chikungunya. Los niveles de IL-6 e IFN- γ estuvieron ocho y dos veces (Me 12.30 y Me 23.66) más elevados en pacientes con enfermedad aguda que en el grupo con enfermedad crónica (Me 1.52 y Me 23.66).

Tabla 5. Comparación de citocinas en pacientes con infección aguda y crónica por CHIKV

Variables	Agudos n=50				Crónicos n=89				Diferencia de medianas U de Mann whitney Valor de p
	Me	RI	Min	Máx	Me	RI	Min	Máx	
pg/ml									
GM-CSF	3.47	3.24	0.56	3.81	3.47	0.00	3.47	3.47	1.00
IFN- γ	23.66	3058.49	5.14	3063	14.40	5.88	8.52	14.40	0.000
IL-10	1.06	74.95	0.23	75.18	1.06	0.00	1.06	1.06	0.001
IL-12	38.60	12.72	25.87	38.60	38.60	0.00	38.60	38.60	0.019
IL-13	133.21	137.79	121.55	259.35	133.21	137.79	121.55	259.35	0.38
IL-17 α	2.88	12.41	1.13	13.55	2.88	0.00	2.88	2.88	0.021
IL-2	8.96	61.42	8.96	70.39	8.96	48.21	8.96	57.18	0.31
IL-4	4.51	27.63	4.51	32.15	4.51	6,79	4.51	11.31	0.20
IL-5	1.83	3.97	1.83	5.81	1.83	0.00	1.83	1.83	0.000
IL-6	12.30	203.64	0.58	204.22	1.52	6.50	0.13	6.64	0.000
LT- α /TNF- β	1.81	6.67	1.81	8.49	1.81	0.00	1.81	1.81	0.18

TGF- α	9.96	1379.00	1.87	1380	8.85	47.42	0.26	47.69	0.78
TNF- α	2.60	16.99	0.31	17.31	2.60	7.87	0.76	8.63	0.03

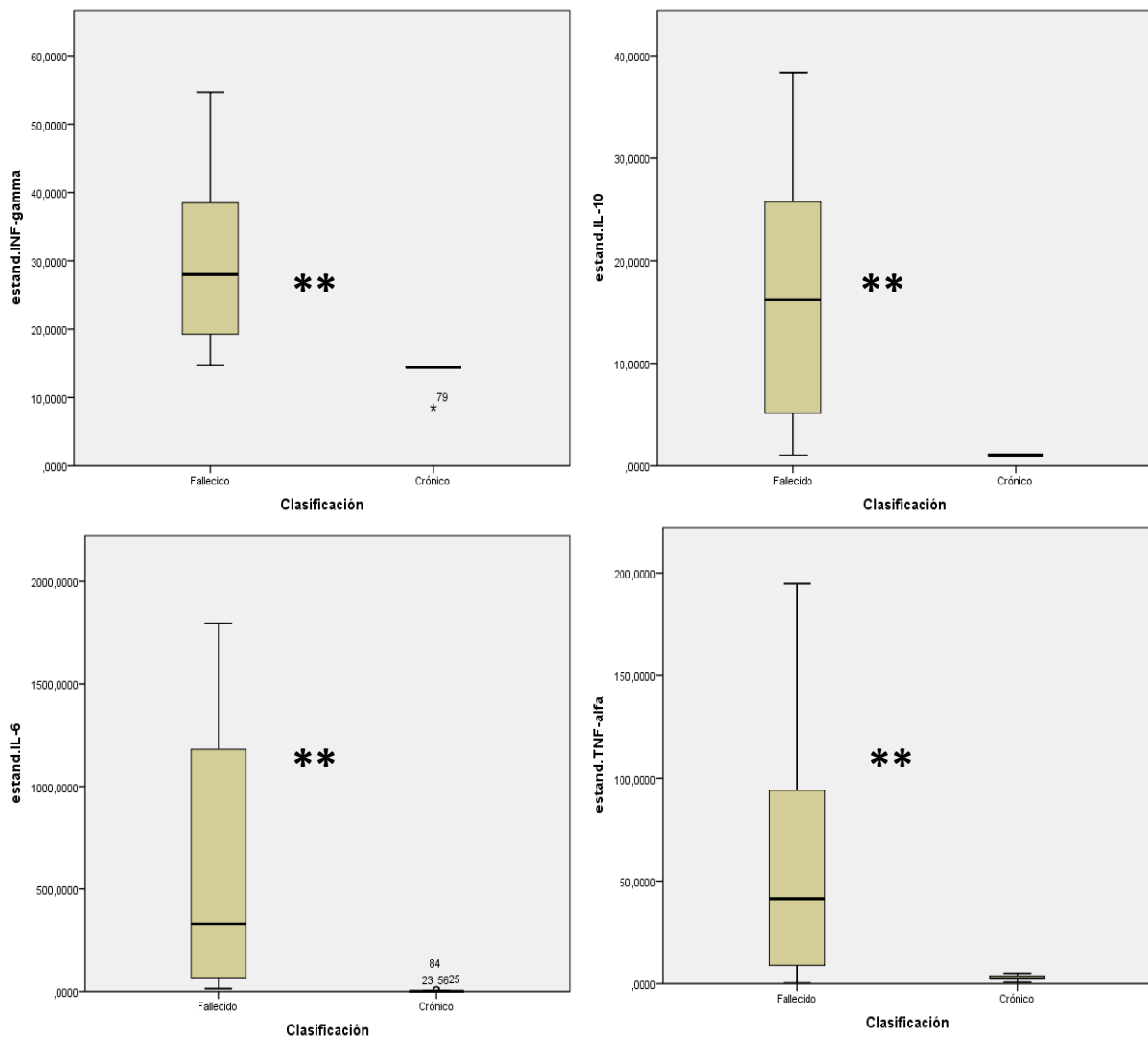
La **tabla 6**, se realiza la comparación de pacientes fallecidos por infección del VCHIK y pacientes con enfermedad crónica por VCHIK. A excepción de GM-CSF e IL-12, la comparación de medianas de las demás citocinas (IFN-gamma, IL-10, IL-13, IL-17a, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, LT- α /TNF- β , TGF- α , TNF- α) entre los dos grupos de pacientes presentó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Al analizar de forma particular los pacientes con enfermedad crónica, no hubo ningún cambio en seis citocinas (GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-17a, IL-5 y LT- α /TNF-b).

Tabla 6. Comparación de citocinas en pacientes con infección crónica y fallecidos por VCHIK

Variables	Fallecidos n=25				Crónicos n=89				Diferencia de medianas U de Mann whitney
	Me	RI	Min	Máx	Me	RI	Min	Máx	Valor de p
pg/ml									
GM-CSF	3.47	2879.43	0.56	2880	3.47	0.00	3.47	3.47	0.05
IFN- γ	35.36	534.70	14.75	549.45	14.40	5.88	8.52	14.40	0.00
IL-10	19.44	878.93	1.06	880	1.06	0.00	1.06	1.06	0.00
IL-12	38.60	203.06	25.87	228.93	38.60	0.00	38.60	38.60	1.00
IL-13	133.21	3547.08	133.21	3680	133.21	137.79	121.55	259.35	0.003
IL-17a	3.99	64.55	1.13	65.69	2.88	0.00	2.88	2.88	0.00
IL-2	8.96	241.41	8.96	250.38	8.96	48.21	8.96	57.18	0.00
IL-4	32.15	223.50	4.16	227.66	4.51	6,79	4.51	11.31	0.00
IL-5	2.55	17.08	1.83	18.91	1.83	0.00	1.83	1.83	0.00
IL-6	717.82	10891.11	13.70	10904	1.52	6.50	0.13	6.64	0.00
LT- α /TNF-b	1.81	19.91	1.81	21.73	1.81	0.00	1.81	1.81	0.007
TGF- α	27.13	116.79	5.11	121.90	8.85	47.42	0.26	47.69	0.00
TNF- α	36.95	874.56	0.31	874.88	2.60	7.87	0.76	8.63	0.00

En el **gráfico 2** se muestran las citocinas que presentaron mayor diferencia significativa en pacientes con enfermedad aguda fatal comparado con pacientes con enfermedad crónica.

Gráfico 2. Citocinas de pacientes con enfermedad aguda fatal y enfermedad crónica



**** Diferencias significativas. comparación de medianas U Mann-Whitney**

9. Discusión

La mayoría de los estudios han evaluado el perfil inmunológico de la enfermedad por arbovirosis en especial del VCHIK en la fase aguda, crónica, o han comparado los pacientes con infección aguda contra un grupo control sin la infección (95,96,98,137,139,140) y pocos han estudiado el perfil de las citocinas en pacientes con desenlace fatal. Este es el primer estudio realizado en Colombia, que aporta evidencia sobre los niveles de citocinas en las fases aguda, aguda con desenlace fatal y crónica de pacientes con FChik.

En la fase aguda, nosotros hallamos que la mediana del IFN- γ se encontró ligeramente por encima de sus valores de referencia (VR); los niveles en pacientes fallecidos estuvieron 0.7 veces por encima de los VR; mientras que, en pacientes con evolución crónica los valores disminuyeron a la mitad comparado con los casos agudos. Esto es coherente con lo encontrado en un estudio realizado en ratones adultos que tuvieron delección en el factor de respuesta al interferón 3-7 (IRF3/7^{-/-}), lo cual generó disminución de los niveles de IFN- α/β y elevación de los niveles de IFN- γ , IL-6 y TNF, con la consiguiente formas severas de FChik (hemorragias y choque) (141). Contrario a lo anterior, en el caso de otros alfavirus como WNV, investigadores han demostrado que la falta de producción de IFN- γ ha sido relacionado con el incremento en la vulnerabilidad al neurotropismo del WNV, generando una infección letal en ratones, esto sugiere que el IFN- γ tiene un efecto protector durante la infección por WNV, debido a que éste regula los pasos que permiten disminuir la carga viral y mejorar la supervivencia (140,142).

En una forma más discreta, nuestro estudio también reveló diferencias estadísticamente significativas cuando comparamos la mediana de IL-2, IL-5, IL-10, IL-12, IL-17 α , TNF- α , en pacientes con enfermedad aguda no fatal y pacientes con enfermedad crónica. Adicional a las citocinas anteriores, cuando se compararon pacientes con EAF y pacientes con EC, se encontró diferencias estadísticamente significativas por elevación de las IL-4, IL-13, LT- α /TNF- β , TGF- α ; estos hallazgos se correlacionan con los resultados de diferentes estudios realizados en humanos

y animales (ratones y primates), los cuales encontraron un incremento de mediadores pro-inflamatorios como IL-6, TNF- α , IFN- α/β e IFN- γ luego de una infección por el VCHIK (98,139,143,144). El primer estudio que permitió establecer diferencias entre las formas leve y severa del chikungunya por medio de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento fue realizado en el suero de 10 pacientes del Sur y Sureste asiático (Bangladesh, India, Malasia y Singapur), los autores encontraron que pacientes con enfermedad severa (encefalitis y otros compromisos sistémico) tuvieron una elevación significativa de IL-4 e IL-5 comparado con un grupo control, y a diferencia de nuestro estudio, ellos encontraron disminución de los niveles de IFN- γ , lo cual asociaron a severidad (145). De igual forma, otros autores han encontrado incremento de las citocinas IL-2R, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15 e IFN- α en pacientes con infección aguda comparado con sujetos sanos, siendo la más alta la IL-6 (137,146). Por último, una revisión sistemática (139) encontró que durante la fase aguda de la enfermedad por VCHIK existe un patrón de citocinas que se elevan (IFN- α , IFN- γ , IL-2, IL-2R, IL-6, IL-7, IL-12 e IL-18), lo cual pareciera ser la firma del virus.

De igual manera, así como lo han documentado diferentes autores, en nuestro estudio la IL-6 fue la citocina con mayor variabilidad, pues en los casos de EANF la mediana de sus niveles se encontraron dos veces por encima de los VR; en pacientes fallecidos la mediana fue 100 veces por encima de los VR, a diferencia de los pacientes con EC cuya mediana estuvo 6 veces por debajo de los VR. La relevancia de esta citocina, ha sido atribuida a diferentes factores: 1. Se ha relacionado con la carga viral (junto con IFN α , IL-12, GM-CSF, IL-10 y MCP-1) (147), 2. Con severidad de la enfermedad (junto a incremento de IL-1 β y la disminución de los RANTES) (48,146) y 3. Como predictor de infección bacteriana severa, choque séptico y mortalidad (junto con TNF- α) con niveles por encima de 1000pg/mL (148,149). Esta correlación también ha sido observada en pacientes con virus de inmunodeficiencia humana (VIH), en un estudio de casos anidados a una cohorte, se compararon los niveles de citocinas en 142 pacientes fallecidos con 284

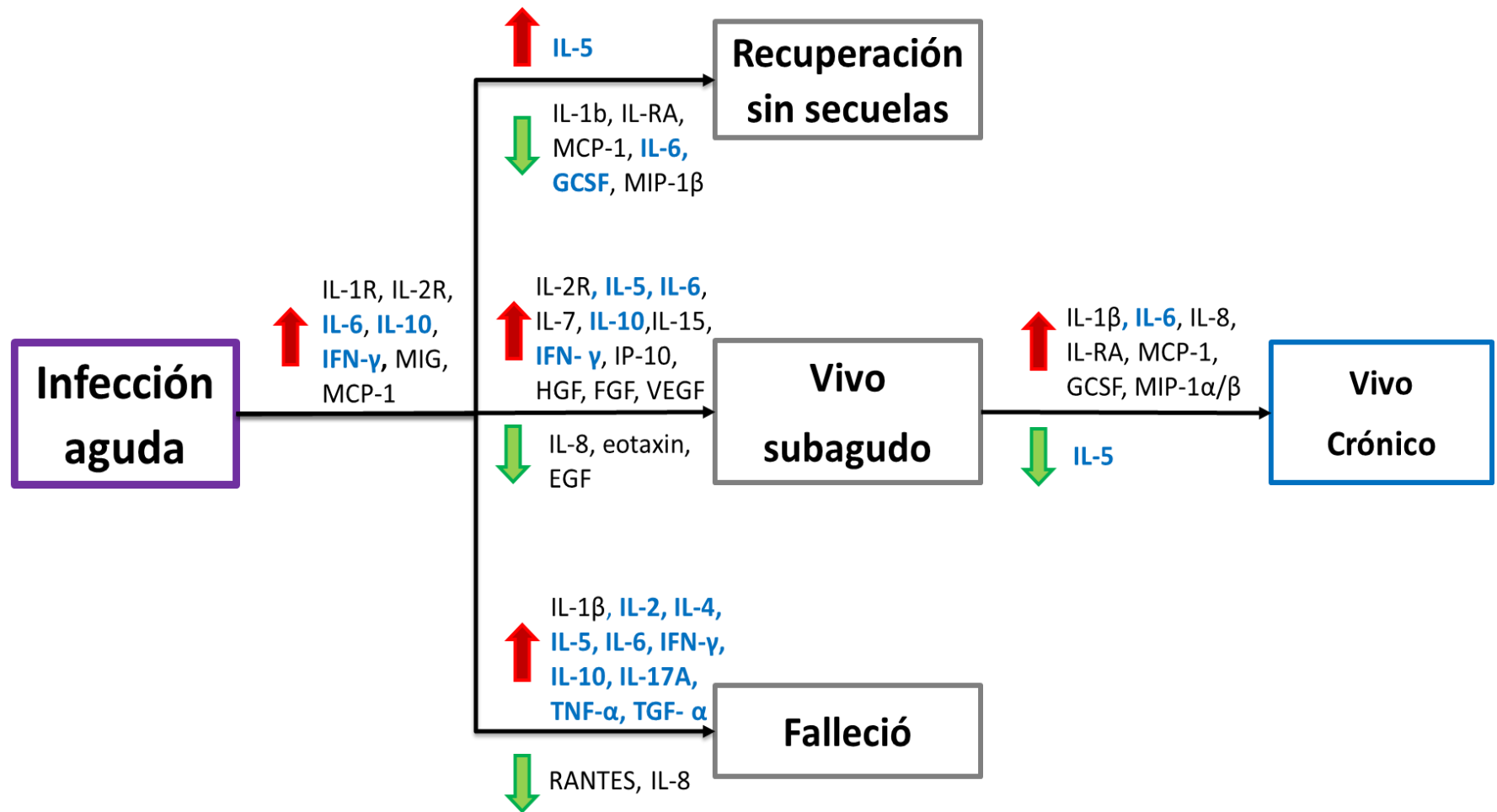
controles, encontrando que los niveles elevados de IL-6 estuvieron asociados a mortalidad por cualquier causa, sugiriendo la posibilidad de esta citocina como biomarcador informativo, mientras que los niveles elevados de la quimiocina CXCL-8 podría proveer información acerca de la causa de mortalidad (148). Fisiológicamente la IL-6 se eleva dentro de los 60 minutos posteriores a una injuria, tiene una vida media muy corta con un pico máximo entre las 4 y 6 horas, aunque nuestros resultados son limitados y se requieren estudios de tipo analítico o experimental, se podría pensar que la IL-6 es una de las citocinas que puede estar marcando el curso de la enfermedad y su persistencia en sangre es directamente proporcional con el daño causado en el organismo.

En nuestro estudio, los pacientes con enfermedad crónica, no tuvieron elevación de las citocinas por encima de los VR, solo se observó que la GM-CSF tuvo niveles similares en todos los grupos, al igual que la IL-12 cuando se comparó con pacientes con EANF. Sin embargo, diferentes estudios han encontrado similitud entre los mediadores inflamatorios inducidos por los alfavirus y los presentes en la artritis reumatoidea, como CXCL9/MIG e IP-10 (150–152), los cuales no se determinaron en el presente estudio. El SINV por ejemplo, induce la secreción de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e incremento de la expresión de MMP1 y 3 (153); en el caso del VRR se ha encontrado elevados niveles de quimiocinas CCL-2 (también conocida como MCP-1), TNF e IFN- γ (154–157). En estudios desarrollados en modelos de animales para el MAYV, la persistencia de IL-13, IL-7 y VEGF estuvieron relacionadas con el desarrollo de artralgias (158). En cuanto al Chikungunya crónico, muchos estudios han llegado a la conclusión de que la IL-6 (un promedio de 17.6 ± 10.3 pg/mL) (95) es probablemente el biomarcador más confiable, ya que se relaciona fuertemente con la severidad y persistencia de las manifestaciones musculo-articulares, incluso su uso a nivel clínico podría estar determinado en su capacidad de predecir la artritis inducida por el virus (95). Otros estudios, han encontrado que además de la persistencia de IL-6, también se encuentran elevados biomarcadores como MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β y el GM-CSF, este último si se determinó en nuestro estudio, pero

no se encontró variación alguna (147). Investigadores encontraron que pacientes en fase convaleciente presentaron niveles más elevados de IL-18 y bajos niveles de IL-18BP comparado con los pacientes en la fase aguda (111), por tanto los autores sugieren que la infección por VCHIK promueve la respuesta Th-1 y que estas dos citocinas podrían ser un futuro blanco terapéutico para el alivio de los síntomas (111).

Una limitación del presente estudio, es que no hizo medición de niveles de citocinas en pacientes sanos o aquellos que se recuperaron con éxito de la enfermedad, que permitiera conocer los niveles de estos marcadores en caso de resolución. De hecho, diferentes autores han encontrado que, cuando se comparan cuantitativamente los niveles séricos de citocinas de pacientes en fase convaleciente de la enfermedad con pacientes con enfermedad aguda, los niveles séricos de las citocinas IL-18BP (111), IL-6, GM-CSF, MCP1 y TNF- α eran significativamente ($p < 0.001$) menor, comparado con niveles elevados de IL-18 (98,111). Así mismo, en Italia un estudio de seguimiento inmunológico a pacientes desde la fase aguda hasta la convaleciente de la enfermedad (a los 6 y 12 meses), encontró que los niveles de IL-6, CXCL2, CXCL9 y CXCL10 estuvieron más elevados en la primera fase y posteriormente disminuyeron de forma significativa, en especial CXCL9 y CXCL10 cuyo descenso en el seguimiento estuvo entre 1000 y 10000 veces, mientras que al inicio de la fase aguda TNF- α , IFN- γ e IL-5 tenían niveles bajos, los cuales incrementaron en el seguimiento a 6 y 12 meses, por su parte las citocinas IL-2, IL-4 y IL-8 no tuvieron cambio significativo desde el inicio de los síntomas hasta los 12 meses de seguimiento (140). Por tanto, la disminución de los niveles de las citocinas puede ser indicio de que el paciente está evolucionando hacia la recuperación. Con base en nuestros resultados y al de otros autores, la **gráfica 3**, muestra las citocinas de acuerdo a las fases de la enfermedad, de acuerdo a nuestros hallazgos y a lo reportado en la literatura (96,146).

Gráfico 3. Presencia de citocinas de acuerdo a evolución de la enfermedad



10. Sesgos y Limitaciones

El presente estudio tuvo como limitaciones el número de pacientes, dado que es una patología con baja mortalidad, y no se tuvo numerosos registros de casos fallecidos por FChik, sin embargo, todos los casos confirmados como defunciones directas o indirectas al INS y de las cuales se tenía la muestra mínima necesaria para el procesamiento fueron incluidos en el presente análisis.

Así mismo, cuenta con las limitaciones inherentes a un estudio con fuente de información secundaria, ya que no se pudo tener acceso a variables de información como co-morbilidades, factores de riesgo u otros datos sociodemográficos de los pacientes que estuvieron hospitalizados por enfermedad de Chikungunya, lo cual no permitió la realización de análisis de regresión logística para determinar factores de riesgo relacionados con mortalidad.

Sin embargo, se tuvo certeza de que la muestra procedente de pacientes fallecidos por VCHIK era secundaria a esta patología, debido a los distintos comités interdisciplinarios que analizaron los casos.

Conclusiones

La enfermedad del VCHIK guarda relación con los otros miembros de alfavirus, no solo en las manifestaciones clínicas y complicaciones a largo plazo que pueda generar, sino también a nivel inmunológico.

Dependiendo del estadio de la enfermedad, la respuesta inmune frente al CHIKV puede variar, en el caso de etapa aguda el predominio inmunológico es Th1, presentando incremento de IFN- γ , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 e IL-17a y TNF- α . Si estas citocinas persisten elevadas por más de tres meses con algo de disminución de los niveles de IFN- γ e IL-6, entonces el paciente estaría avanzando a la fase crónica de la enfermedad. Lo cual se verá reflejado en las artralgias y artritis muchas veces incapacitantes manifestada por los pacientes.

Si el cuadro clínico progresa al deterioro hemodinámico y neurológico con persistencia y elevación de las citocinas de fase aguda, adicionándose IL-2, IL-4, IL-13, LT- α /TNF-b, TGF- α , entonces el paciente presentará la fase severa de VCHIK, lo cual parece ser común en los estados de choque séptico por otras causas. La IL-6 se ha relacionado con la carga viral (147), con la severidad de la enfermedad y como predictor de infección bacteriana severa, choque séptico y mortalidad (148,149).

Por tanto, el estudio de las citocinas en especial la IL-6, junto con otros biomarcadores inmunológicos, cada día se convierten en una herramienta de seguimiento, evolución y pronóstico de la enfermedad por VCHIK.

Se sugiere la realización de nuevos estudios que permitan determinar los puntos de corte de las distintas fases de la enfermedad, en especial que permitan predecir el desenlace de la misma en pacientes con y sin riesgos asociados.

Referencias bibliográficas

1. Mavalankar D, Shastri P, Bandyopadhyay T, Parmar J, Ramani KV. Increased Mortality Rate Associated with Chikungunya Epidemic, Ahmedabad, India. *Emerg Infect Dis.* marzo de 2008;14(3):412–5.
2. Mavalankar D, Puwar T, Murtola T, Vasan S. Quantifying the impact of Chikungunya and Deengue on tourism revenues. *Indian Inst Manag Ahmedabad.* 2009;1–28.
3. Muyembe-Tamfum JJ, Peyrefitte CN, Yogoledo R, Mathina Basisya E, Koyange D, Pukuta E, et al. [Epidemic of Chikungunya virus in 1999 and 200 in the Democratic Republic of the Congo]. *Med Trop Rev Corps Sante Colon.* 2003;63(6):637–8.
4. Rusnak JM, Kortepeter MG, Aldis J, Boudreau E. Experience in the Medical Management of Potential Laboratory Exposures to Agents of Bioterrorism on the Basis of Risk Assessment at the United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (USAMRIID): *J Occup Environ Med.* agosto de 2004;46(8):801–11.
5. Woodruff AW, Bowen ET, Platt GS. Viral infections in travellers from tropical Africa. *Br Med J.* el 15 de abril de 1978;1(6118):956–8.
6. Pile JC, Henchal EA, Christopher GW, Steele KE, Pavlin JA. Chikungunya in a North American traveler. *J Travel Med.* junio de 1999;6(2):137–9.
7. Lumsden WH. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953 II. General description and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* enero de 1955;49(1):33–57.
8. Pan American Health Organization, World Health Organization. Number of reported cases of Chikungunya fever in the Americas, by country or territory 2013. *Epidemiological week/EW 52 (Update 3 January 2014)* [Internet]. 2014 ene p. 1. (Epidemiological Week). Report No.: 1. Disponible en: <file:///E:/TESIS/Inmunologia%20Chik/Epidemiologia/PAHO%20reporte%20Chik%20Dic%202013.pdf>
9. Pan American Health Organization, World Health Organization. Number of reported cases of Chikungunya fever in the Americas, by country or territory with autochthonous transmission. *Epidemiological week/EW 28 (Updated 11 July 2014)* [Internet]. 2014 jul [citado el 5 de septiembre de 2017] p. 2. Report No.: 28. Disponible en: <file:///C:/Users/Cindy/Downloads/2014-jul-11-cha-CHIKV-authoch-imported-cases-ew-28.pdf>

10. Burt FJ, Rolph MS, Rulli NE, Mahalingam S, Heise MT. Chikungunya: a re-emerging virus. *The Lancet*. febrero de 2012;379(9816):662–71.
11. Gutierrez-Saravia E, Gutierrez CE. Chikungunya Virus in the Caribbean: A Threat for All of the Americas. *J Pediatr Infect Dis Soc*. el 1 de marzo de 2015;4(1):1–3.
12. Evans-Gilbert T. Chikungunya and Neonatal Immunity: Fatal Vertically Transmitted Chikungunya Infection. *Am J Trop Med Hyg* 2017;16–0491.
13. Crosby L, Perreau C, Madeux B, Cossic J, Armand C, Herrmann-Storke C, et al. Severe manifestations of chikungunya virus in critically ill patients during the 2013–2014 Caribbean outbreak. *Int J Infect Dis*. julio de 2016;48:78–80.
14. Gérardin P, Barau G, Michault A, Bintner M, Randrianaivo H, Choker G, et al. Multidisciplinary Prospective Study of Mother-to-Child Chikungunya Virus Infections on the Island of La Réunion. Chretien J-P, editor. *PLoS Med*. el 18 de marzo de 2008;5(3):e60.
15. Simon F, Tolou H, Jeandel P. Chikungunya, l'épidémie que l'on n'attendait pas. *Rev Médecine Interne*. junio de 2006;27(6):437–41.
16. World Health Organization. Chikungunya in India [Internet]. 2006 oct p. 1. (Global alert and response (GAR)). Disponible en: http://www.who.int/csr/don/2006_10_17/en/
17. Manimunda SP, Mavalankar D, Bandyopadhyay T, Sugunan AP. Chikungunya epidemic-related mortality. *Epidemiol Infect*. septiembre de 2011;139(09):1410–2.
18. Staples JE, Fischer M. Chikungunya Virus in the Americas — What a Vectorborne Pathogen Can Do. *N Engl J Med*. el 4 de septiembre de 2014;371(10):887–9.
19. Morens DM, Fauci AS. Chikungunya at the Door — Déjà Vu All Over Again? *N Engl J Med*. el 4 de septiembre de 2014;371(10):885–7.
20. Pimentel R, Skewes-Ramm R, Moya J. [Chikungunya in the Dominican Republic: lessons learned in the first six months]. *Rev Panam Salud Publica Pan Am J Public Health*. noviembre de 2014;36(5):336–41.
21. Pan American Health Organization, World Health Organization. Number of reported cases of Chikungunya fever in the Americas, by country or territory 2017, Cumulative cases. *Epidemiological week/EW* (Updated as of 1 September 2017) [Internet]. 2017 sep p. 1. Disponible en:

http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=41765&lang=en

22. Instituto Nacional de Salud. Chikungunya en Colombia, el inicio de la transmisión autóctona, 2014 [Internet]. Bogotá; 2014 sep p. 21. (Informe quincenal epidemiológico nacional). Report No.: Volumen 19, N° 18. Disponible en:
<http://www.ins.gov.co/iqen/IQUEN/IQUEN%20vol%2019%202014%20num%2018.pdf>
23. Instituto Nacional de Salud. 2015 Boletín epidemiológico Semana 52.pdf [Internet]. 2015 [citado el 8 de abril de 2018]. Disponible en:
<http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2015%20Boletin%20epidemiologico%20Semana%2052.pdf>
24. Instituto Nacional de Salud. 2016 Boletín epidemiológico semana 52 -.pdf [Internet]. 2016 [citado el 8 de abril de 2018]. Disponible en:
<http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2016%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2052%20-.pdf>
25. Instituto Nacional de Salud. 2017 Boletín epidemiológico semana 52.pdf [Internet]. 2017 [citado el 8 de abril de 2018]. Disponible en:
<http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2017%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2052.pdf>
26. Instituto Nacional de Salud. 2018 Boletín epidemiológico semana 13.pdf [Internet]. 2018 [citado el 8 de abril de 2018]. Disponible en:
<http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2018%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2013.pdf>
27. Leparc-Goffart I, Nougairède A, Cassadou S, Prat C, de Lamballerie X. Chikungunya in the Americas. *The Lancet*. febrero de 2014;383(9916):514.
28. Tsetsarkin KA, Chen R, Sherman MB, Weaver SC. Chikungunya virus: evolution and genetic determinants of emergence. *Curr Opin Virol*. octubre de 2011;1(4):310–7.
29. Thiberville S-D, Moyen N, Dupuis-Maguiraga L, Nougairède A, Gould EA, Roques P, et al. Chikungunya fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. *Antiviral Res*. septiembre de 2013;99(3):345–70.

30. Rodríguez-Morales AJ, Cardona-Ospina JA, Villamil-Gómez W, Paniz-Mondolfi AE. How many patients with post-chikungunya chronic inflammatory rheumatism can we expect in the new endemic areas of Latin America? *Rheumatol Int.* diciembre de 2015;35(12):2091–4.
31. Rodríguez-Morales AJ, Cardona-Ospina JA, Fernanda Urbano-Garzón S, Sebastian Hurtado-Zapata J. Prevalence of Post-Chikungunya Infection Chronic Inflammatory Arthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis: Chronic Inflammatory Rheumatism Following Chikungunya. *Arthritis Care Res.* diciembre de 2016;68(12):1849–58.
32. Araujo AQC, Silva MTT, Araujo APQC. Zika virus-associated neurological disorders: a review. *Brain* 2016;139(8):2122–30.
33. Coronell-Rodríguez W, Arteta-Acosta C, Suárez-Fuentes MA, Burgos-Rolon MC, Rubio-Sotomayor MT, Sarmiento-Gutiérrez M, et al. [Zika virus infection in pregnancy, fetal and neonatal impact]. *Rev Chil Infectologia* 2016;33(6):665–73.
34. Ramful D, Carbonnier M, Pasquet M, Bouhmani B, Ghazouani J, Noormahomed T, et al. Mother-to-Child Transmission of Chikungunya Virus Infection: *Pediatr Infect Dis J.* septiembre de 2007;26(9):811–5.
35. Edwards T, Signor L del CC, Williams C, Donis E, Cuevas LE, Adams ER. Co-infections with Chikungunya and Dengue Viruses, Guatemala, 2015. *Emerg Infect Dis.* noviembre de 2016;22(11):2003–5.
36. Gandhi B, Kulkarni K, Godbole M, Dole S., Kapur S., Satpathy P. Dengue and Chikungunya co-infection associated with more severe clinical disease than mono-infection. *Int J Healthc Biomed Res.* abril de 2015;3(3):117–23.
37. Deeba F, Afreen N, Islam A, Naqvi IH, Broor S, Ahmed A, et al. Co-infection with Dengue and Chikungunya Viruses. En: Rodríguez-Morales AJ, editor. *Current Topics in Chikungunya* [Internet]. InTech; 2016 [citado el 7 de septiembre de 2017]. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/current-topics-in-chikungunya/co-infection-with-dengue-and-chikungunya-viruses>
38. Hoz JM de la, Bayona B, Vilorio S, Accini JL, Juan-Vergara HS, Viasus D. Fatal cases of Chikungunya virus infection in Colombia: Diagnostic and treatment challenges. *J Clin Virol.* agosto de 2015;69:27–9.
39. Rodríguez-Morales AJ, Cardona-Ospina JA, Villamil-Gómez WE. Chikungunya, a Global Threat Currently Circulating in Latin America. En: Rodríguez-Morales AJ, editor. *Current Topics in Chikungunya* [Internet]. InTech; 2016 [citado el 8 de septiembre de 2017]. Disponible en:

<http://www.intechopen.com/books/current-topics-in-chikungunya/chikungunya-a-global-threat-currently-circulating-in-latin-america>

40. Pinheiro TJ, Guimarães LF, Silva MTT, Soares CN. Neurological manifestations of Chikungunya and Zika infections. *Arq Neuropsiquiatr*. noviembre de 2016;74(11):937–43.
41. Mercado M, Acosta-Reyes J, Parra E, Pardo L, Rico A, Campo A, et al. Clinical and histopathological features of fatal cases with dengue and chikungunya virus co-infection in Colombia, 2014 to 2015. *Eurosurveillance* [Internet]. el 2 de junio de 2016 [citado el 8 de septiembre de 2017];21(22). Disponible en: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=22489>
42. Beesoon S, Funkhouser E, Kotea N, Spielman A, Robich RM. Chikungunya Fever, Mauritius, 2006. *Emerg Infect Dis*. febrero de 2008;14(2):337–8.
43. Cardona-Ospina JA, Henao-SanMartin V, Paniz-Mondolfi AE, Rodríguez-Morales AJ. Mortality and fatality due to Chikungunya virus infection in Colombia. *J Clin Virol*. septiembre de 2015;70:14–5.
44. Sá PK de O, Nunes M de M, Leite IR, Campelo M das GL das C, Leão CFR, Souza JR de, et al. Chikungunya virus infection with severe neurologic manifestations: report of four fatal cases. *Rev Soc Bras Med Trop*. marzo de 2017;50(2):265–8.
45. Rajapakse S, Rodrigo C, Rajapakse A. Atypical manifestations of chikungunya infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. febrero de 2010;104(2):89–96.
46. Ferreira-Sarmiento S, Lastra-Terán KP, de la Rosa D, Viasus D. Severe Chikungunya virus infection. *Salud Uninorte*. el 1 de junio de 2015;31(3):631–41.
47. Ng LFP, Chow A, Sun Y-J, Kwek DJC, Lim P-L, Dimatatac F, et al. IL-1 β , IL-6, and RANTES as Biomarkers of Chikungunya Severity. Unutmaz D, editor. *PLoS ONE*. el 21 de enero de 2009;4(1):e4261.
48. Lohachanakul J, Phuklia W, Thannagith M, Thonsakulprasert T, Ubol S. High concentrations of circulating interleukin-6 and monocyte chemotactic protein-1 with low concentrations of interleukin-8 were associated with severe chikungunya fever during the 2009-2010 outbreak in Thailand: Determinants of chikungunya severity. *Microbiol Immunol* 2012;56(2):134–8.

49. Liu Y-J. IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors. *Annu Rev Immunol.* abril de 2005;23(1):275–306.
50. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Baker DL. *Cellular and molecular immunology.* 8. ed., internat. ed. Philadelphia, Pa: Elsevier, Saunders; 2015. 535 p.
51. Hansmann L, Groeger S, von Wulffen W, Bein G, Hackstein H. Human monocytes represent a competitive source of interferon- α in peripheral blood. *Clin Immunol.* mayo de 2008;127(2):252–64.
52. Rudd PA, Wilson J, Gardner J, Larcher T, Babarit C, Le TT, et al. Interferon Response Factors 3 and 7 Protect against Chikungunya Virus Hemorrhagic Fever and Shock. *J Virol.* el 15 de septiembre de 2012;86(18):9888–98.
53. Her Z, Teng T-S, Tan JJ, Teo T-H, Kam Y-W, Lum F-M, et al. Loss of TLR3 aggravates CHIKV replication and pathology due to an altered virus-specific neutralizing antibody response. *EMBO Mol Med.* el 1 de enero de 2015;7(1):24–41.
54. Partrick DA, Moore FA, Moore EE, Biffl WL, Sauaia A, Barnett CC. Jack A. Barney Resident Research Award winner. The inflammatory profile of interleukin-6, interleukin-8, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in postinjury multiple organ failure. *Am J Surg.* noviembre de 1996;172(5):425–9; discussed 429-431.
55. Keel M, Ecknauer E, Stocker R, Ungethüm U, Steckholzer U, Kenney J, et al. Different pattern of local and systemic release of proinflammatory and anti-inflammatory mediators in severely injured patients with chest trauma. *J Trauma.* junio de 1996;40(6):907–12; discussion 912-914.
56. Aggarwal A, Baker CS, Evans TW, Haslam PL. G-CSF and IL-8 but not GM-CSF correlate with severity of pulmonary neutrophilia in acute respiratory distress syndrome. *Eur Respir J.* mayo de 2000;15(5):895–901.
57. Remick DG, Bolgos GR, Siddiqui J, Shin J, Nemzek JA. Six at six: interleukin-6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days. *Shock Augusta Ga.* junio de 2002;17(6):463–7.
58. Roumen RM, Hendriks T, van der Ven-Jongekrijg J, Nieuwenhuijzen GA, Sauerwein RW, van der Meer JW, et al. Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma. Relation with subsequent adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure. *Ann Surg.* diciembre de 1993;218(6):769–76.

59. Law MM, Cryer HG, Abraham E. Elevated levels of soluble ICAM-1 correlate with the development of multiple organ failure in severely injured trauma patients. *J Trauma*. julio de 1994;37(1):100–9; discussion 109-110.
60. Bahrami S, Redl H, Yao YM, Schlag G. Involvement of bacteria/endotoxin translocation in the development of multiple organ failure. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996;216:239–58.
61. Frink M, van Griensven M, Kobbe P, Brin T, Zeckey C, Vaske B, et al. IL-6 predicts organ dysfunction and mortality in patients with multiple injuries. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. el 27 de septiembre de 2009;17:49.
62. Simmons EM, Himmelfarb J, Sezer MT, Chertow GM, Mehta RL, Paganini EP, et al. Plasma cytokine levels predict mortality in patients with acute renal failure. *Kidney Int*. el 1 de abril de 2004;65(4):1357–65.
63. Cytokine profile in severe gram-positive and gram-negative abdominal sepsis | *Scientific Reports* [Internet]. [citado el 18 de septiembre de 2017]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/srep11355>
64. Lemant J, Boisson V, Winer A, Thibault L, André H, Tixier F, et al. Serious acute chikungunya virus infection requiring intensive care during the reunion island outbreak in 2005–2006*: *Crit Care Med*. septiembre de 2008;36(9):2536–41.
65. Teng T-S, Kam Y-W, Lee B, Hapuarachchi HC, Wimal A, Ng L-C, et al. A Systematic Meta-analysis of Immune Signatures in Patients With Acute Chikungunya Virus Infection. *J Infect Dis*. el 15 de junio de 2015;211(12):1925–35.
66. Chirathaworn C, Poovorawan Y, Lertmaharit S, Wuttirattanakowit N. Cytokine levels in patients with chikungunya virus infection. *Asian Pac J Trop Med*. agosto de 2013;6(8):631–4.
67. Muyembe-Tamfum JJ, Peyrefitte CN, Yogolelo R, Mathina Basisya E, Koyange D, Pukuta E, et al. [Epidemic of Chikungunya virus in 1999 and 200 in the Democratic Republic of the Congo]. *Med Trop Rev Corps Sante Colon*. 2003;63(6):637–8.
68. Eisenhut M, Schwarz TF, Hegenscheid B. Seroprevalence of dengue, chikungunya and Sindbis virus infections in German aid workers. *Infection*. abril de 1999;27(2):82–5.
69. Thiberville S-D, Boisson V, Gaudart J, Simon F, Flahault A, de Lamballerie X. Chikungunya Fever: A Clinical and Virological Investigation of Outpatients

- on Reunion Island, South-West Indian Ocean. Tesh RB, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. el 17 de enero de 2013;7(1):e2004.
70. Serгон K, Njuguna C, Kalani R, Ofula V, Onyango C, Konongoi LS, et al. Seroprevalence of Chikungunya virus (CHIKV) infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. *Am J Trop Med Hyg*. febrero de 2008;78(2):333–7.
 71. Sissoko D, Ezzedine K, Moendandzé A, Giry C, Renault P, Malvy D. Field evaluation of clinical features during chikungunya outbreak in Mayotte, 2005-2006. *Trop Med Int Health* [Internet]. febrero de 2010 [citado el 9 de septiembre de 2017]; Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3156.2010.02485.x>
 72. Outbreak news. Chikungunya and dengue, south-west Indian Ocean. *Releve Epidemiol Hebd*. el 24 de marzo de 2006;81(12):106–8.
 73. Ratsitorahina M, Harisoa J, Ratovonjato J, Biacabe S, Reynes J-M, Zeller H, et al. Outbreak of Dengue and Chikungunya Fevers, Toamasina, Madagascar, 2006. *Emerg Infect Dis*. julio de 2008;14(7):1135–7.
 74. Sourisseau M, Schilte C, Casartelli N, Trouillet C, Guivel-Benhassine F, Rudnicka D, et al. Characterization of Reemerging Chikungunya Virus. *PLoS Pathog*. 2007;3(6):e89.
 75. Borgherini G, Poubeau P, Staikowsky F, Lory M, Moullec NL, Becquart JP, et al. Outbreak of Chikungunya on Reunion Island: Early Clinical and Laboratory Features in 157 Adult Patients. *Clin Infect Dis*. el 1 de junio de 2007;44(11):1401–7.
 76. Seneviratne SL, Perera J. Fever epidemic moves into Sri Lanka. *BMJ*. el 9 de diciembre de 2006;333(7580):1220–1.
 77. Chikungunya Outbreaks. *N Engl J Med*. el 21 de junio de 2007;356(25):2650–2.
 78. AbuBakar S, Sam I-C, Wong P-F, NorAzyiah MatRahim, Hooi P-S, Roslan N. Reemergence of Endemic Chikungunya, Malaysia. *Emerg Infect Dis*. enero de 2007;13(1):147–9.
 79. Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli A, Panning M, et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *The Lancet*. diciembre de 2007;370(9602):1840–6.
 80. Nasci RS. Movement of Chikungunya Virus into the Western Hemisphere. *Emerg Infect Dis*. agosto de 2014;20(8):1394–5.

81. Higgs S, Vanlandingham D. Chikungunya Virus and Its Mosquito Vectors. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* abril de 2015;15(4):231–40.
82. Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Semana Epidemiológica (SE) 36 [Internet]. 2014 p. 6. Report No.: volumen 35, N° 21. Disponible en: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/30/BE-2014-45--21----Dengue--SE36--e-CHIKV--SE37-.pdf>
83. Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Semana epidemiológica 51, 2015. [Internet]. Brasil; 2016 p. 9. Report No.: Volumen 47, N°2. Disponible en: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/15/svs2016-be002-dengue-se51.pdf>
84. Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Semana Epidemiológica 33 [Internet]. 2017 p. 13. Report No.: Volumen 48, N°27. Disponible en: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/agosto/29/2017-026-Monitoramento-dos-casos-de-dengue-febre-de-chikungunya-e-febre-pelo-virus-Zika-ate-a-Semana-Epidemiologica-33-de-2017.pdf>
85. Instituto Nacional de Salud. Chikungunya en Colombia, el inicio de la transmisión autóctona, 2014 [Internet]. Bogotá; 2014 sep p. 21. (Informe quincenal epidemiológico nacional). Report No.: Volumen 19, N° 18. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/iqen/IQUEN/IQEN%20vol%2019%202014%20num%2018.pdf>
86. Instituto Nacional de Salud. Boletín epidemiológico semana 52. 2014.
87. Brault AC, Tesh RB, Powers AM, Weaver SC. Re-emergence of chikungunya and o'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *J Gen Virol.* el 1 de febrero de 2000;81(2):471–9.
88. Miller MJ, Loaiza JR. Geographic Expansion of the Invasive Mosquito *Aedes albopictus* across Panama—Implications for Control of Dengue and Chikungunya Viruses. Harley D, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* el 8 de enero de 2015;9(1):e0003383.
89. Burt FJ, Chen W, Miner JJ, Lenschow DJ, Merits A, Schnettler E, et al. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. *Lancet Infect Dis.* abril de 2017;17(4):e107–17.

90. Agarwal A, Dash PK, Singh AK, Sharma S, Gopalan N, Rao PVL, et al. Evidence of Experimental Vertical Transmission of Emerging Novel ECSA Genotype of Chikungunya Virus in *Aedes aegypti*. Turell MJ, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. el 31 de julio de 2014;8(7):e2990.
91. Assunção-Miranda I, Cruz-Oliveira C, Da Poian AT. Molecular Mechanisms Involved in the Pathogenesis of Alphavirus-Induced Arthritis. *BioMed Res Int*. 2013;2013:1–11.
92. Wesula Olivia L, Obanda V, Bucht G, Mosomtai G, Otieno V, Ahlm C, et al. Global emergence of Alphaviruses that cause arthritis in humans. *Infect Ecol Epidemiol*. enero de 2015;5(1):29853.
93. Strauss JH, Strauss EG. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev*. septiembre de 1994;58(3):491–562.
94. Pialoux G, Gaüzère B-A, Jauréguiberry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *Lancet Infect Dis*. mayo de 2007;7(5):319–27.
95. Sepúlveda-Delgado J, Vera-Lastra OL, Trujillo-Murillo K, Canseco-Ávila LM, Sánchez-González RA, Gómez-Cruz O, et al. Inflammatory biomarkers, disease activity index, and self-reported disability may be predictors of chronic arthritis after chikungunya infection: brief report. *Clin Rheumatol* 2017;36(3):695–9.
96. Chaaithanya IK, Muruganandam N, Sundaram SG, Kawalekar O, Sugunan AP, Manimunda SP, et al. Role of Proinflammatory Cytokines and Chemokines in Chronic Arthropathy in CHIKV Infection. *Viral Immunol*. agosto de 2011;24(4):265–71.
97. Suhrbier A, Jaffar-Bandjee M-C, Gasque P. Arthritogenic alphaviruses—an overview. *Nat Rev Rheumatol*. julio de 2012;8(7):420–9.
98. Chirathaworn C, Poovorawan Y, Lertmaharit S, Wuttirattanakowit N. Cytokine levels in patients with chikungunya virus infection. *Asian Pac J Trop Med*. agosto de 2013;6(8):631–4.
99. Chen R, Wang E, Tsetsarkin KA, Weaver SC. Chikungunya Virus 3' Untranslated Region: Adaptation to Mosquitoes and a Population Bottleneck as Major Evolutionary Forces. Vignuzzi M, editor. *PLoS Pathog*. el 29 de agosto de 2013;9(8):e1003591.
100. Leung JY-S, Ng MM-L, Chu JJH. Replication of Alphaviruses: A Review on the Entry Process of Alphaviruses into Cells. *Adv Virol*. 2011;2011:1–9.

101. Mayer SV, Tesh RB, Vasilakis N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. *Acta Trop.* febrero de 2017;166:155–63.
102. Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential. *PLoS Pathog.* 2007;3(12):e201.
103. Schuffenecker I, Iteman I, Michault A, Murri S, Frangeul L, Vaney M-C, et al. Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak. *PLoS Med.* el 23 de mayo de 2006;3(7):e263.
104. Solignat M, Gay B, Higgs S, Briant L, Devaux C. Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. *Virology.* octubre de 2009;393(2):183–97.
105. Lum F-M, Ng LFP. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. *Antiviral Res.* agosto de 2015;120:165–74.
106. Schwartz O, Albert ML. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nat Rev Microbiol.* julio de 2010;8(7):491–500.
107. Versteeg L, Febres MEC, Beaumier CM. The Role of Cellular Immune Responses on Chikungunya Virus Infection-Induced Arthritis. *Curr Trop Med Rep.* junio de 2016;3(2):60–6.
108. Couderc T, Chrétien F, Schilte C, Disson O, Brigitte M, Guivel-Benhassine F, et al. A Mouse Model for Chikungunya: Young Age and Inefficient Type-I Interferon Signaling Are Risk Factors for Severe Disease. *PLoS Pathog.* 2008;4(2):e29.
109. Ng LFP. Immunopathology of Chikungunya Virus Infection: Lessons Learned from Patients and Animal Models. *Annu Rev Virol* [Internet]. el 29 de septiembre de 2017 [citado el 11 de septiembre de 2017];4(1). Disponible en: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-virology-101416-041808>
110. Kelvin AA, Banner D, Silvi G, Moro ML, Spataro N, Gaibani P, et al. Inflammatory Cytokine Expression Is Associated with Chikungunya Virus Resolution and Symptom Severity. *Powers AM*, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* el 16 de agosto de 2011;5(8):e1279.
111. Chirathaworn C, Rianthavorn P, Wuttirattanakowit N, Poovorawan Y. Serum IL-18 and IL-18BP Levels in Patients with Chikungunya Virus Infection. *Viral Immunol.* febrero de 2010;23(1):113–7.

112. Couderc T, Lecuit M. Focus on Chikungunya pathophysiology in human and animal models. *Microbes Infect.* diciembre de 2009;11(14–15):1197–205.
113. Wauquier N, Becquart P, Nkoghe D, Padilla C, Ndjoyi-Mbiguino A, Leroy EM. The acute phase of Chikungunya virus infection in humans is associated with strong innate immunity and T CD8 cell activation. *J Infect Dis.* el 1 de julio de 2011;204(1):115–23.
114. Hoarau J-J, Jaffar Bandjee M-C, Krejbich Trotot P, Das T, Li-Pat-Yuen G, Dassa B, et al. Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. *J Immunol Baltim Md 1950.* el 15 de mayo de 2010;184(10):5914–27.
115. Sánchez R, Monserrat J, Prieto A, Reyes E, Álvarez de Mon M, Sánchez M. Balance entre citocinas pro y antiinflamatorias en estados sépticos. *Med Intensiva.* 2005;29(3):151–8.
116. Fros JJ, Liu WJ, Prow NA, Geertsema C, Ligtenberg M, Vanlandingham DL, et al. Chikungunya Virus Nonstructural Protein 2 Inhibits Type I/II Interferon-Stimulated JAK-STAT Signaling. *J Virol.* el 15 de octubre de 2010;84(20):10877–87.
117. Noret M, Herrero L, Rulli N, Rolph M, Smith PN, Li RW, et al. Interleukin 6, RANKL, and osteoprotegerin expression by chikungunya virus-infected human osteoblasts. *J Infect Dis.* el 1 de agosto de 2012;206(3):455-457: 457-459.
118. Kumar N, Gupta V, Thomas N. Brownie-nose: hyperpigmentation in neonatal chikungunya. *Indian Pediatr.* mayo de 2014;51(5):419.
119. Economopoulou A, Dominguez M, Helynck B, Sissoko D, Wichmann O, Quenel P, et al. Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005–2006 outbreak on Réunion. *Epidemiol Infect.* abril de 2009;137(04):534.
120. Torres JR, Falleiros-Arlant LH, Dueñas L, Pleitez-Navarrete J, Salgado DM, Castillo JB-D. Congenital and perinatal complications of chikungunya fever: a Latin American experience. *Int J Infect Dis.* octubre de 2016;51:85–8.
121. Thong Wong K, Wei Chiam C, Sam I-C, Chai Ong K, Fun Chan Y. Neurovirulence comparison of chikungunya virus isolates of the Asian and East/Central/South African genotypes from Malaysia. *J Gen Virol.* el 1 de noviembre de 2015;96(11):3243–54.

122. Rollé A, Schepers K, Cassadou S, Curlier E, Madeux B, Hermann-Storck C, et al. Severe Sepsis and Septic Shock Associated with Chikungunya Virus Infection, Guadeloupe, 2014. *Emerg Infect Dis.* mayo de 2016;22(5):891–4.
123. Weiss HJ, Halstead SB, Russ SB. HEMORRHAGIC DISEASE IN RODENTS CAUSED BY CHIKUNGUNYA VIRUS. 1. STUDIES OF HEMOSTASIS. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N.* junio de 1965;119:427–32.
124. Mazaud R, Salaün JJ, Montabone H, Goube P, Bazillio R. [Acute neurologic and sensorial disorders in dengue and Chikungunya fever]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales.* febrero de 1971;64(1):22–30.
125. Obeyesekere I O, Hermon Y. Myocarditis and cardiomyopathy after arbovirus infections (dengue and chikungunya fever). *Br Heart J.* 1972;34(8):821–7.
126. Dupuis-Maguiraga L, Noret M, Brun S, Le Grand R, Gras G, Roques P. Chikungunya Disease: Infection-Associated Markers from the Acute to the Chronic Phase of Arbovirus-Induced Arthralgia. Singh SK, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* el 27 de marzo de 2012;6(3):e1446.
127. Instituto Nacional de Salud. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública - Chikungunya. Bogotá; 2016 mar p. 1–33. (Protocolo de vigilancia en salud Pública).
128. CDC, OPS. Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus Chikungunya en las Américas [Internet]. Washington; 2011 p. 1–159. Disponible en:
http://d5pa5brvrabv4.cloudfront.net/sites/default/files/chikv_spanish.pdf
129. Min Salud, Instituto Nacional de Salud, OPS. Propuesta metodológica para el análisis y clasificación de muertes atribuibles a la enfermedad por virus Chikungunya [Internet]. Bogota; 2015. Disponible en:
<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/ED/Propuesta-metodologica-analisis-clasificacion-muertes-Chikungunya.pdf>
130. Instituto Nacional de Salud. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública - Chikungunya. Bogotá; 2016 mar p. 1–33. (Protocolo de vigilancia en salud Pública).
131. Staples JE, Breiman RF, Powers AM. Chikungunya Fever: An Epidemiological Review of a Re-Emerging Infectious Disease. *Clin Infect Dis.* el 15 de septiembre de 2009;49(6):942–8.
132. Pan American Health Organization, World Health Organization. Chikungunya autochthonous transmission in the Americas, PAHO/WHO [Internet]. 2017 sep. Disponible en:

<http://www.arcgis.com/apps/MapTools/index.html?appid=ce2372254ce743b79d332b43724cd9e5>

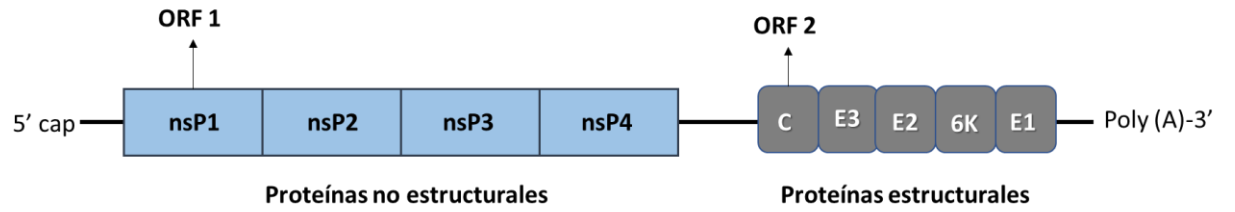
133. Marques CDL, Duarte ALBP, Ranzolin A, Dantas AT, Cavalcanti NG, Gonçalves RSG, et al. Recommendations of the Brazilian Society of Rheumatology for the diagnosis and treatment of chikungunya fever. Part 2 – Treatment. *Rev Bras Reumatol Engl Ed.* 2017;57:438–51.
134. Harrison VR, Eckels KH, Bartelloni PJ, Hampton C. Production and evaluation of a formalin-killed Chikungunya vaccine. *J Immunol Baltim Md* 1950. septiembre de 1971;107(3):643–7.
135. Akahata W, Yang Z-Y, Andersen H, Sun S, Holdaway HA, Kong W-P, et al. A virus-like particle vaccine for epidemic Chikungunya virus protects nonhuman primates against infection. *Nat Med.* el 28 de enero de 2010;16(3):334–8.
136. Kelvin AA, Banner D, Silvi G, Moro ML, Spataro N, Gaibani P, et al. Inflammatory Cytokine Expression Is Associated with Chikungunya Virus Resolution and Symptom Severity. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5(8):e1279.
137. Venugopalan A, Ghorpade RP, Chopra A. Cytokines in Acute Chikungunya. Homann D, editor. *PLoS ONE* 2014;9(10):e111305.
138. Simarmata D, Ng DCE, Kam Y-W, Lee B, Sum MSH, Her Z, et al. Early clearance of Chikungunya virus in children is associated with a strong innate immune response. *Sci Rep* 2016;6(1). Disponible en: <http://www.nature.com/articles/srep26097>
139. Teng T-S, Kam Y-W, Lee B, Hapuarachchi HC, Wimal A, Ng L-C, et al. A Systematic Meta-analysis of Immune Signatures in Patients With Acute Chikungunya Virus Infection. *J Infect Dis.* el 15 de junio de 2015;211(12):1925–35.
140. Kelvin AA, Banner D, Silvi G, Moro ML, Spataro N, Gaibani P, et al. Inflammatory Cytokine Expression Is Associated with Chikungunya Virus Resolution and Symptom Severity. Powers AM, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* el 16 de agosto de 2011;5(8):e1279.
141. Rudd PA, Wilson J, Gardner J, Larcher T, Babarit C, Le TT, et al. Interferon Response Factors 3 and 7 Protect against Chikungunya Virus Hemorrhagic Fever and Shock. *J Virol* 2012;86(18):9888–98.
142. Shrestha B, Wang T, Samuel MA, Whitby K, Craft J, Fikrig E, et al. Gamma Interferon Plays a Crucial Early Antiviral Role in Protection against West Nile Virus Infection. *J Virol.* el 1 de junio de 2006;80(11):5338–48.

143. Patil DR, Hundekar SL, Arankalle VA. Expression profile of immune response genes during acute myopathy induced by chikungunya virus in a mouse model. *Microbes Infect.* mayo de 2012;14(5):457–69.
144. Ng LFP. Immunopathology of Chikungunya Virus Infection: Lessons Learned from Patients and Animal Models. *Annu Rev Virol* [Internet]. el 29 de septiembre de 2017 [citado el 11 de septiembre de 2017];4(1). Disponible en: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-virology-101416-041808>
145. Tripathy AS, Tandale BV, Balaji SS, Hundekar SL, Ramdasi AY, Arankalle VA. Envelope specific T cell responses & cytokine profiles in chikungunya patients hospitalized with different clinical presentations. *Indian J Med Res.* febrero de 2015;141(2):205–12.
146. Ng LFP, Chow A, Sun Y-J, Kwek DJC, Lim P-L, Dimatatac F, et al. IL-1 β , IL-6, and RANTES as Biomarkers of Chikungunya Severity. Unutmaz D, editor. *PLoS ONE* 2009;4(1):e4261.
147. Chow A, Her Z, Ong EKS, Chen J, Dimatatac F, Kwek DJC, et al. Persistent Arthralgia Induced by Chikungunya Virus Infection is Associated with Interleukin-6 and Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor. *J Infect Dis* 2011;203(2):149–57.
148. French MA, Cozzi-Lepri A, Arduino RC, Johnson M, Achhra AC, Landay A. Plasma levels of cytokines and chemokines and the risk of mortality in HIV-infected individuals: a case–control analysis nested in a large clinical trial. *AIDS* 2015;29(7):847–51.
149. Damas P, Ledoux D, Nys M, Vrindts Y, De Groote D, Franchimont P, et al. Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. *Ann Surg.* 1992;215(4):356–62.
150. Ueno A, Yamamura M, Iwahashi M, Okamoto A, Aita T, Ogawa N, et al. The production of CXCR3-agonistic chemokines by synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* julio de 2005;25(5):361–7.
151. Kuan WP, Tam L-S, Wong C-K, Ko FWS, Li T, Zhu T, et al. CXCL 9 and CXCL 10 as Sensitive Markers of Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol.* el 1 de febrero de 2010;37(2):257–64.
152. Hanaoka R, Kasama T, Muramatsu M, Yajima N, Shiozawa F, Miwa Y, et al. A novel mechanism for the regulation of IFN-gamma inducible protein-10 expression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(2):R74-81.

153. Assunção-Miranda I, Bozza MT, Da Poian AT. Pro-inflammatory response resulting from sindbis virus infection of human macrophages: Implications for the pathogenesis of viral arthritis. *J Med Virol.* enero de 2010;82(1):164–74.
154. Suhrbier A, La Linn M. Clinical and pathologic aspects of arthritis due to Ross River virus and other alphaviruses. *Curr Opin Rheumatol.* julio de 2004;16(4):374–9.
155. Lidbury BA, Rulli NE, Suhrbier A, Smith PN, McColl SR, Cunningham AL, et al. Macrophage-Derived Proinflammatory Factors Contribute to the Development of Arthritis and Myositis after Infection with an Arthrogenic Alphavirus. *J Infect Dis.* junio de 2008;197(11):1585–93.
156. Rulli NE, Rolph MS, Srikiatkachorn A, Anantapreecha S, Guglielmotti A, Mahalingam S. Protection From Arthritis and Myositis in a Mouse Model of Acute Chikungunya Virus Disease by Bindarit, an Inhibitor of Monocyte Chemotactic Protein-1 Synthesis. *J Infect Dis.* el 1 de octubre de 2011;204(7):1026–30.
157. Rulli NE, Guglielmotti A, Mangano G, Rolph MS, Apicella C, Zaid A, et al. Amelioration of alphavirus-induced arthritis and myositis in a mouse model by treatment with bindarit, an inhibitor of monocyte chemotactic proteins. *Arthritis Rheum.* agosto de 2009;60(8):2513–23.
158. Santiago FW, Halsey ES, Siles C, Vilcarromero S, Guevara C, Silvas JA, et al. Long-Term Arthralgia after Mayaro Virus Infection Correlates with Sustained Pro-inflammatory Cytokine Response. Bingham A, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* el 23 de octubre de 2015;9(10):e0004104.

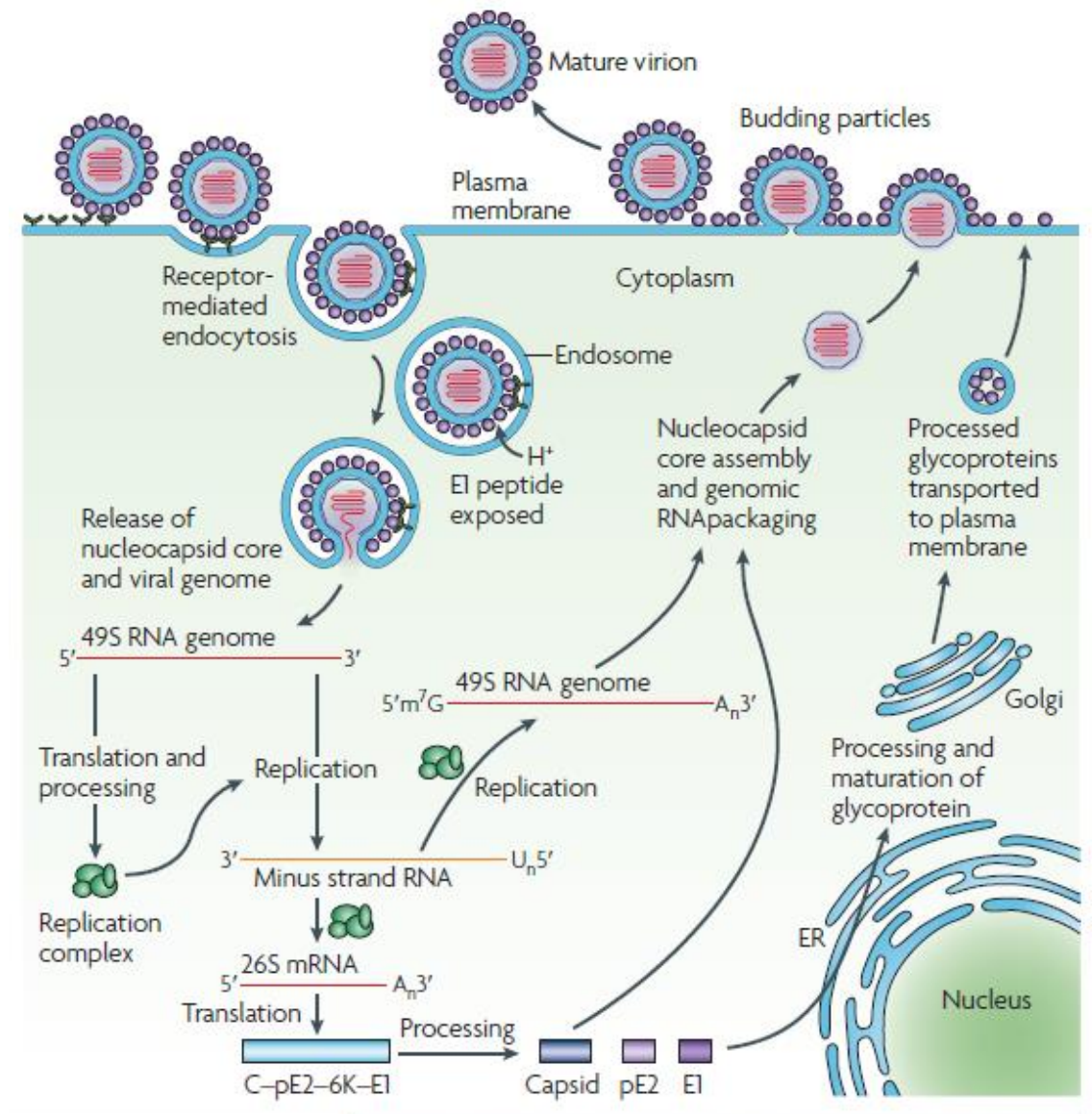
Anexos

Ilustración 1. Genoma del virus chikungunya



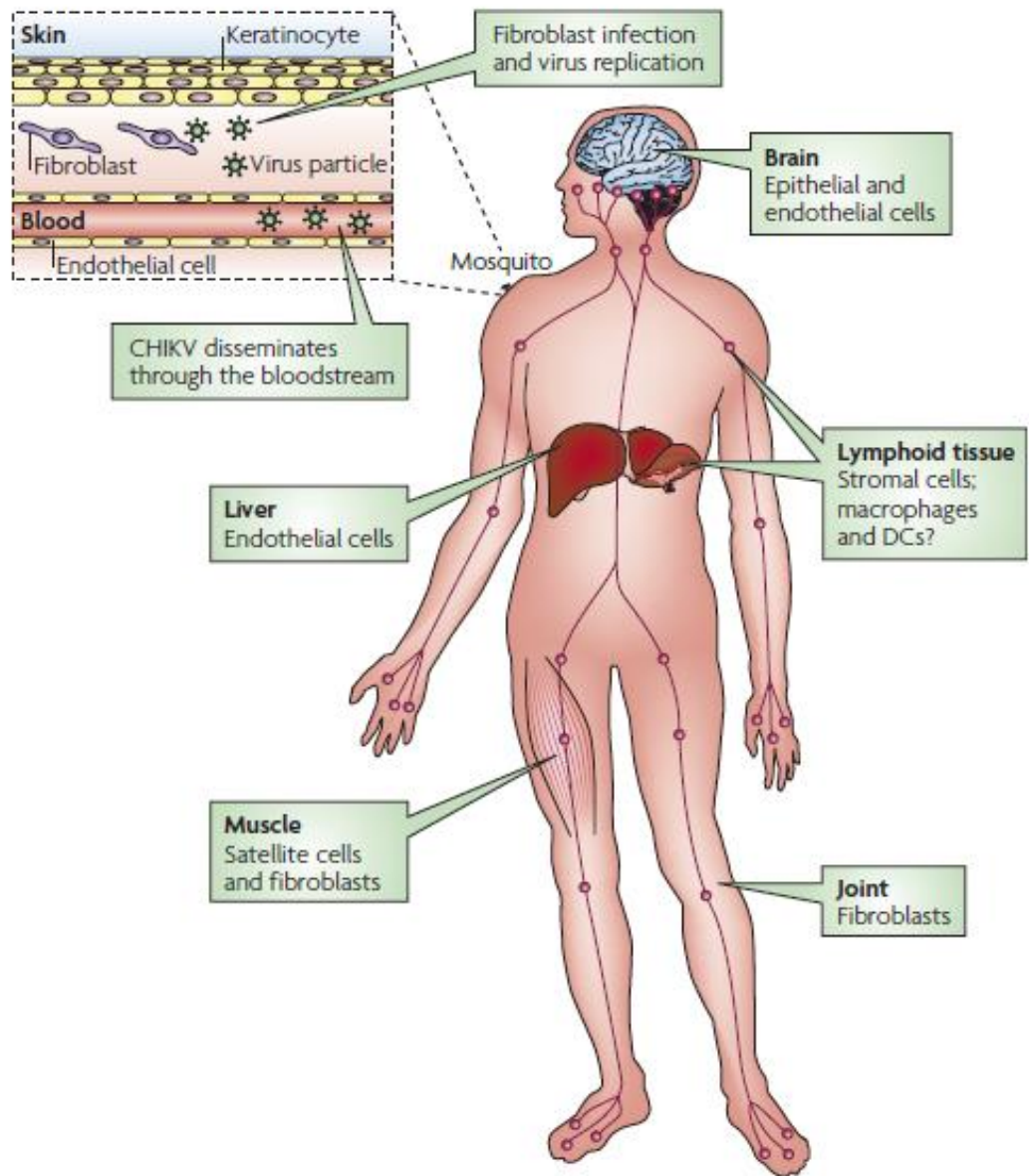
*Creación del autor

Ilustración 2. Ciclo de replicación alfavirus



- Ilustración original de: Schwartz O, Albert M. (106)

Ilustración 3. Diseminación del virus en humanos



- Ilustración original de: Schwartz O, Albert M. (106)

Tabla 7 Anexo. Operacionalización de variables

MACROVARIABLE	VARIABLE	DEFINICIÓN	NATURALEZA	NIVEL	CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN
Características socio-demográficas	Edad	N° de años cumplidos	Cuantitativa continua	Razón	12, 13, 14, 15... 24
	Género	Característica fenotípica que diferencia al hombre de la mujer	Cualitativa	Nominal	Femenino Masculino
	Ciudad de ocurrencia	Lugar donde habita el paciente	Cualitativo	Nominal	Dirección del barrio
	Procedencia	Lugar de donde proviene el caso	Cualitativo	Nominal	Urbano Rural
	Estrato Socio-económico	Clasificación que utiliza el Estado para clasificar los inmuebles residenciales de acuerdo con los lineamientos del DANE	Cualitativa	Ordinal	Uno, dos, tres, cuatro, cinco.
	Seguridad social	Régimen de salud al cual pertenece	Cualitativo	Nominal	Contributivo Subsidiado Vinculado No afiliado
Características Epidemiológicas	Clasificación de caso de Enfermedad por VCHIK	Diagnóstico establecido de acuerdo con la definición de casos	Cualitativa	Nominal	Sospechoso Confirmado por clínica Confirmado por laboratorio
	Condición final	Condición clínica del paciente al egreso	Cualitativa	Nominal	Fallecido Sobreviviente
	Clasificación de casos fallecidos por VCHIK	Clasificación final de causa de deceso posterior a cumplimiento de parámetros	Cualitativa	Nominal	-Muerte relación directa con el VCHIK -Muerte relación indirecta con VCHIK -Descartada
Características Clínicas	Fecha de inicio de síntomas	Fecha de calendario gregoriano de inicio de síntomas	Cuantitativa	Razón	Dd/mm/aaaa
	Tiempo de ingreso y egreso	Diferencia en días entre el día de ingreso y egreso	Cuantitativa	Razón	1, 2, 3, 4...
	Tiempo entre ingreso y fallecimiento	Diferencia de días entre ingreso hospitalario y fallecimiento	Cuantitativa	Razón	1, 2, 3, 4..
	Caso típico	Síntomas clásicos de VCHIK sin desarrollo de complicaciones	Cualitativa	Nominal	Si No
	Caso Atípico	Desarrollo de manifestaciones clínicas atípicas	Cualitativa	Nominal	Si No
Características de laboratorio	PCR	Reactante de fase aguda	Cualitativa	Nominal	Positiva Normal

	Serología IgM para Chikungunya	Anticuerpo indica infección reciente	Cualitativa	Nominal	Positiva Negativa
	Serología IgG para Chikungunya	Anticuerpo de larga duración	Cualitativa	Nominal	Positiva Negativa
	Serología IgM para Dengue	Anticuerpo indica infección reciente	Cualitativa	Nominal	Positiva Negativa
	Serología IgG para Dengue	Anticuerpo de larga duración	Cualitativa	Nominal	Positiva Negativa
	RT-PCR para Chikungunya	Reacción cadena polimerasa transcriptasa inversa para Chikungunya	Cualitativa Cuantitativa	Nominal Razón	Positiva Negativa # de copias
Marcadores inmunológicos	Citocina GM-CSF	Citocina inflamatoria, factor estimulante de colonia monocito-granulocito	Cualitativa	Nominal	Positiva Negativa
	IL-1 beta	Citocina	Cuantitativa	Razón	1...n
	IL-1RA	Citocina	Cuantitativa	Razón	1...n
	IL-2	Citocina	Cuantitativa	Razón	1...n
	IL-2R	Citocina	Cuantitativa	Razón	1...n
	IL-4	Citocina	Cuantitativa	Razón	1...n
	IL-5	Citocina	Cuantitativa	Razón	1...n
	IL-6	Citocina	Cuantitativa	Razón	1...n
	IL-8	Citocina	Cuantitativa	Razón	1...n
	IL-10	Citocina	Cuantitativa	Razón	1...n
	IL-12p40/p70	Citocina	Cuantitativa	Razón	1...n
	IL-13	Citocina	Cuantitativa	Razón	1...n
	IL-15	Citocina	Cuantitativa	Razón	1...n
	IL-17	Citocina	Cuantitativa	Razón	1...n
	TNF- alpha	Citocina	Cuantitativa	Razón	1...n
	TNF-beta	Citocina	Cuantitativa	Razón	1...n
	Th1/Th2	Citocina	Cuantitativa	Razón	1...n
	INF-gamma	Citocina	Cuantitativa	Razón	1...n
	Quimioquinas eotoxin	quimioquinas	Cuantitativa	Razón	1...n
	IP-10	Quimioquinas	Cuantitativa	Razón	1...n
	MCP-1	Quimioquinas	Cuantitativa	Razón	1...n
	MIG	Quimioquinas	Cuantitativa	Razón	1...n
	MIP-1 alpha	Quimioquinas	Cuantitativa	Razón	1...n
	MIP-1beta	quimioquinas	Cuantitativa	Razón	1...n
	RANTES	Quimioquinas	Cuantitativa	Razón	1...n
	CCL22	Quimioquinas	Cuantitativa	Razón	1...n
	Fractalkine	Quimioquinas	Cuantitativa	Razón	1...n
	EGF	Factor de crecimiento	Cuantitativa	Razón	1...n
	HGF	Factor de crecimiento	Cuantitativa	Razón	1...n
	FGF-basic	Factor de crecimiento	Cuantitativa	Razón	1...n
	G-CSF	Factor de crecimiento	Cuantitativa	Razón	1...n
VEGF	Factor de crecimiento	Cuantitativa	Razón	1...n	
Flt-3 ligando	Factor de crecimiento	Cuantitativa	Razón	1...n	

	sCD40L	coagulación	Cuantitativa	Razón	1...n
--	--------	-------------	--------------	-------	-------