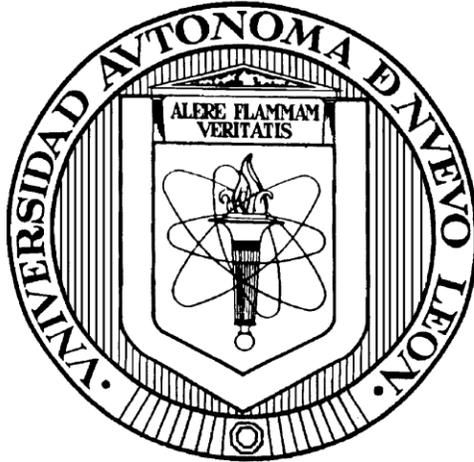


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS CHIKUNGUNYA
EN MÉXICO**

**POR
M.C. KAME ALBERTO GALÁN HUERTA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E
INGENIERÍA GENÉTICA**

SEPTIEMBRE, 2018

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS CHIKUNGUNYA
EN MÉXICO**

**POR
M.C. KAME ALBERTO GALÁN HUERTA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E
INGENIERÍA GENÉTICA**

**DIRECTOR DE TESIS
DR. C. ANA MARÍA GUADALUPE RIVAS ESTILLA**

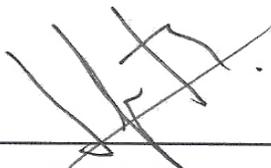
SEPTIEMBRE, 2018

Epidemiología molecular del Virus Chikungunya en México

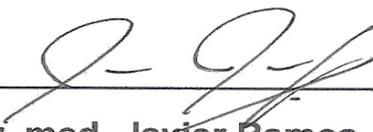
Aprobación de la Tesis:



Dra. C. Ana María Guadalupe Rivas Estilla
Directora de Tesis



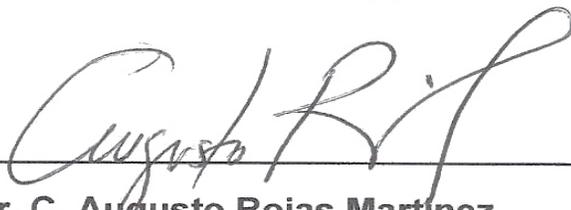
Dr. C. Ildelfonso Fernández Salas
Co-Director de Tesis



Dr. med. Javier Ramos Jiménez
Miembro de la Comisión



Dra. C. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez
Miembro de la Comisión



Dr. C. Augusto Rojas Martínez
Miembro de la Comisión



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Infectología Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León; y en el Laboratorio de Arbovirología y Control de Vectores del Centro Regional de Investigación en Salud Pública, perteneciente al Instituto Nacional de Salud Pública. Bajo la dirección de la Dra. Ana María Guadalupe Rivas Estilla.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABLAS	iii
ABREVIATURAS	v
RESUMEN	viii
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Epidemiología	1
1.2 Biología molecular del virus.....	4
1.3 Variabilidad Genética y filogenia.....	6
1.4 Manifestaciones clínicas.....	6
1.5 Diagnóstico.....	7
1.6 Tratamiento.....	8
1.7 Prevención.....	9
1.8 Patogénesis.....	10
CAPÍTULO 2 ANTECEDENTES	13
2.1 Fiebre Chikungunya en México.....	13
2.2 Patogénesis del linaje asiático.....	16
CAPÍTULO 3 JUSTIFICACIÓN	20
CAPÍTULO 4 OBJETIVOS	21
4.1 Objetivo general.....	21
4.2 Objetivos específicos.....	21
CAPÍTULO 5 METODOLOGÍA	22
5.1 Estrategia experimental.....	22
5.2 Identificación de casos.....	22
5.3 Toma de muestra sanguínea y separación.....	24
5.4 Detección de anticuerpos contra CHIKV.....	25

5.5 Detección de anticuerpos contra DENV.....	25
5.6 Extracción de ARN.....	26
5.7 Detección de ARN viral por medio de PCR.....	26
5.7.1 Detección de CHIKV por medio de RT-qPCR.....	26
5.7.2 Detección de DENV por medio de RT-PCR.....	28
5.7.3 Detección de ZIKV por medio de RT-qPCR.....	29
5.8 Definición de grupos a estudiar.....	31
5.9 Georreferenciación de casos positivos para CHIKV.....	31
5.10 Determinación de pruebas de función hepática.....	31
5.11 Cultivo de células C6/36.....	32
5.12 Infección células C6/36 y cosecha viral.....	32
5.13 Amplificación del gen de envoltura viral 1 y 2.....	33
5.14 Protocolo para amplificación por PCR.....	34
5.15 Electroforesis de los fragmentos amplificados de los genes E1 y E2.....	35
5.16 Purificación del producto amplificado.....	36
5.17 Cuantificación de ADN extraído.....	36
5.18 Reacción de secuenciación de los genes E1 y E2 de CHIKV.....	36
5.19 Reconstrucción filogenética de virus Chikungunya por máxima similitud...	38
5.20 Reconstrucción filogenética del virus Chikungunya por máxima credibilidad de clado.....	41
5.21 Predicción de plegamiento proteico.....	42
5.22 Asociación variantes genéticas de CHIKV con manifestaciones clínicas	42
5.23 Análisis estadístico.....	42
5.24 Aspectos éticos.....	43
CAPITULO 6 RESULTADOS.....	44
6.1 Características demográficas y epidemiológicas de la población estudiada...	44
6.2 Comparación entre pacientes con fiebre Chikungunya y EFAI.....	45
6.3 Comparación entre pacientes con infección confirmada por RT-qPCR e IgM.....	56
6.4 Análisis multivariado de las variables estudiadas.....	61
6.5 Evaluación del daño hepático en la fiebre Chikungunya.....	63
6.6 Análisis filogenético.....	70

6.6.1 Secuencias del gen de la proteína de envoltura 1.....	70
6.6.2 Secuencias del gen de la proteína de envoltura 2.....	71
6.7 Análisis de mutaciones.....	75
6.8 Presentación clínica específica de virus.....	81
6.8.1 Virus ancestrales vs. divergentes.....	81
6.8.2 Virus de diferentes clados.....	86
6.8.3 Detección de diferentes virus en el mismo domicilio.....	90
CAPÍTULO 7 DISCUSIÓN.....	92
CAPÍTULO 8 CONCLUSIÓN.....	99
CAPÍTULO 9 REFERENCIAS.....	100

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Transmisión autóctona de Chikungunya	2
2	Estados de México con mayor número de casos de fiebre Chikungunya	3
3	Distribución del genoma viral de CHIKV	4
4	Ciclo de replicación viral de los Alfavirus	5
5	Reconstrucción filogenética de los diferentes linajes de CHIKV	6
6	Historia natural de la fiebre Chikungunya	7
7	Patogénesis de CHIKV	11
8	Árbol filogenético creado por análisis Bayesiano donde se muestra la relación de los aislados de México	13
9	Árbol filogenético donde se muestra la relación de los aislados de Yucatán	14
10	Curva epidémica de los casos autóctonos de fiebre chikungunya en México	15
11	Diferentes desenlaces patológicos inducidos por virus de La Réunion y el Caribe en ratones.	18
12	Sobrevida e inflamación de ratones A129 infectados con diferentes linajes de CHIKV	19
13	Estrategia general para abordar los objetivos planteados	22
14	Días transcurridos y edad de los pacientes evaluados	45
15	Número de articulaciones afectadas y cantidad de dolor presentado por los pacientes.	48
16	Distribución de la artralgia presentada por los dos grupos de pacientes evaluados	49
17	Distribución de artritis presentada por los pacientes evaluados	50
18	Distribución del exantema en los pacientes estudiados	51
19	Ayuda requerida reportada por los pacientes evaluados	51
20	Distribución del dolor presentado por los pacientes en función de la edad	52
21	Distribución del dolor presentado por los pacientes en función del número de articulaciones afectadas por artralgia	52
22	Distribución de artralgia y artritis en la primera entrevista y 14 meses después de cuatro pacientes con CHIKF crónica.	53

23	Distribución de los casos confirmados de fiebre Chikungunya en Tapachula, Chiapas.	55
24	Áreas afectadas por exantema en función de los días transcurridos después del inicio de síntomas.	60
25	Número de articulaciones afectadas por artralgia en función del dolor en pacientes confirmados por RT-qPCR e IgM.	61
26	Concentración de fosfatasa alcalina en los sujetos estudiados.	65
27	Concentración de alanina aminotransferasa en los sujetos estudiados.	66
28	Concentración de aspartato aminotransferasa en los sujetos estudiados.	66
29	Concentración de γ -glutamyl transferasa en los sujetos estudiados.	67
30	Concentración de bilirrubina directa en los sujetos estudiados.	67
31	Concentración de bilirrubina total en los sujetos estudiados.	68
32	Concentración de bilirrubina indirecta en los sujetos estudiados.	69
33	Concentración de colesterol en los sujetos estudiados.	69
34	Reconstrucción de filogenia máxima similitud del gen E1 I	72
35	Reconstrucción de filogenia máxima similitud del gen E1 II	73
36	Reconstrucción de filogenia máxima credibilidad de clado del gen E1	74
37	Distribución de los diferentes virus aislados en el estado de Chiapas	75
38	Reconstrucción de la filogenia máxima similitud del gen E2	76
39	Reconstrucción de la filogenia máxima credibilidad de clado del gen E2	77
40	Modelaje de la estructura terciaria de la proteína E1 mutada (V4A) y silvestre	78
41	Modelaje de la estructura terciaria de la proteína E1 mutada (A342V) y silvestre.	79
42	Modelaje de la estructura terciaria de la proteína E2 mutada (V113A) y silvestre	80
43	Distribución de ayuda y dolor presentados por los pacientes de grupos ancestral y divergente	85
44	Distribución de ayuda y dolor presentados por los pacientes infectados con diferentes clados	90
45	Distribución de la artralgia presentada por el padre y el hijo	91

LISTA DE TABLAS

TABLA	CONTENIDO	PÁGINA
1	Manifestaciones clínicas de los 95 casos virémicos y postvirémicos	16
2	Secuencias de iniciadores y sonda de Lanciotti para detectar CHIKV	27
3	Condiciones de reacción de RT-qPCR para detectar CHIKV	27
4	Programa de temperaturas de la RT-qPCR para detectar CHIKV	27
5	Secuencia de iniciadores utilizados en la PCR	28
6	Condiciones de reacción de PCR	28
7	Programas de temperatura PCR	29
8	Secuencias de iniciadores y sonda de Lanciotti para detectar ZIKV	30
9	Condiciones de reacción de RT-qPCR para detectar ZIKV	30
10	Programa de temperaturas de la RT-qPCR para detectar ZIKV	30
11	Valores normales de las pruebas de función hepática	32
12	Secuencia de iniciadores utilizados para la amplificación del gen E1 y E2	33
13	Condiciones de reacción para síntesis de ADNc	33
14	Condiciones de reacción para síntesis de ADNc II.	34
15	Programa de temperatura síntesis de ADNc.	34
16	Condiciones de reacción amplificación genes E1 y E2	35
17	Programa de temperatura amplificación genes E1 y E2	35
18	Iniciadores secuenciación genes E1 y E2	37
19	Componentes de la reacción de secuenciación	37
20	Programa de temperaturas utilizado en secuenciación	37
21	Secuencias utilizadas para el análisis filogenético	38
22	Manifestaciones clínicas presentadas por los pacientes evaluados	46
23	Manifestaciones clínicas presentadas por los pacientes evaluados (RT-qPCR vs. IgM)	56
24	Distribución de la artralgia en los dos grupos de pacientes con infección confirmada.	58
25	Articulaciones con artritis en los dos grupos de pacientes con infección confirmada	59
26	Áreas afectadas por exantema en los pacientes de los grupos RT-qPCR e IgM	59
27	Análisis multivariado asociado a la fiebre Chikungunya	62

28	Parámetros clínicos utilizados para distinguir entre fiebre por CHIKV y EFAI	63
29	Distribución de valores anormales de pruebas de función hepática	64
30	Manifestaciones clínicas presentadas por los grupos ancestral y divergente	81
31	Distribución de la artralgia en los grupos ancestral y divergente	83
32	Distribución de la artritis en los grupos ancestral y divergente	84
33	Áreas afectadas por exantema en los grupos ancestral y divergente	84
34	Manifestaciones clínicas presentadas por los pacientes infectados con diferentes clados	86
35	Artralgia presentada por los pacientes infectados con diferentes clados	87
36	Artritis presentada por los pacientes infectados con diferentes clados	88
37	Exantema presentado por los pacientes infectados con diferentes clados	89

ABREVIATURAS y SÍMBOLOS

aa	Aminoácidos
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
ALA	Alanina
ALP	Fosfatasa alcalina
ALT	Alanina aminotransferasa
ARN	Acido Ribonucleico
AST	Aspartato aminotransferasa
BD	Bilirrubina directa
BI	Bilirrubina indirecta
BT	Bilirrubina total
CARPHA	Agencia de Salud Pública del Caribe
CCL5	Ligando de quimiocina 5
CDC	Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos
CENAPRECE	Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades
CHIKF	Fiebre Chikungunya
CHIKV	Virus Chikungunya
Chis	Chiapas
Chol	Colesterol
CO₂	Dióxido de carbono
DENV	Virus del dengue
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
E1	Envoltura 1
E2	Envoltura 2
ECSA	Este/Centro/Sur de África
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
EVA	Escala visual análoga
g	Gramos
GGT	γ -glutamil transferasa

IF	Articulación interfalángica
IFD	Articulación interfalángica distal
IFN- α	Interferón alfa
IFP	Articulación interfalángica proximal
IgG	Inmunoglobulina de isotipo G
IgM	Inmunoglobulina de isotipo M
IL	Interleucina
ILE	Isoleucina
IOL	Linaje Océano Índico
IP-10	Proteína 10 inducida por interferón gamma
kb	Kilobases
M	Molar
MAC	Captura de anticuerpos
MCF	Articulación metacarpofalángica
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
MIF	Factor inhibitorio de migración de macrófagos
min	Minutos
MIP-1	Proteína inflamatoria de macrófago
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MTF	Articulación metatarsofalángica
N	Normal
ng	Nanogramos
nM	Nanomolar
nm	Nanómetro
OPS	Organización Panamericana de la Salud
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa

RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a retrotranscripción
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
s	Segundos
S	Signo
SBF	Suero bovino fetal
SDF-1 α	Factor estromal derivado de célula 1
SE	Semana epidemiológica
Sx	Síntoma
TBE	Tris/borato/EDTA
TMB	3,3',5,5'- tetrametilbencidina
V	Volts
VAL	Valina
VLP	Partículas parecidas a virus
WA	Oeste de África
ZIKV	Virus Zika
μM	Micromolar

RESUMEN

M.C. Kame Alberto Galán Huerta Fecha de graduación: septiembre 2018

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Título del Estudio: “**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS CHIKUNGUNYA EN MÉXICO**”

Número de páginas: 111

Introducción: El virus Chikungunya (CHIKV) es un alfavirus que se transmite por picadura de mosquito y causa la fiebre por Chikungunya, una enfermedad febril caracterizada por artralgia intensa, mialgia, cefalea y exantema. Aunque se han descrito las manifestaciones clínicas de esta enfermedad, la presentación clínica exacta presentada por la población mexicana se desconoce. También se desconoce la variedad genética de los virus circulantes. **Objetivos:** Identificar la presentación clínica de la infección por CHIKV en población mexicana, además verificar los virus circulantes, sus variaciones genéticas, relaciones filogenéticas con otros virus y si éstas se relacionan con las diferentes manifestaciones clínicas presentadas. **Metodología:** Se estudiaron pacientes infectados con CHIKV de Tapachula, Chiapas en el mes de junio de 2015. Se incluyeron pacientes con enfermedad febril aguda y presentación clínica compatible. Se recabaron las manifestaciones clínicas, se evaluó el dolor y si se requería ayuda para realizar actividades cotidianas. Se confirmó la infección por CHIKV por medio de RT-qPCR y ELISA para IgM. Se estableció diagnóstico diferencial con otros arbovirus. Se secuenciaron los genes de las proteínas E1 y E2 de los virus aislados de los pacientes y se realizó análisis filogenético utilizando el método de máxima similitud y máxima credibilidad de clado. **Resultados:** Se estudiaron 52 pacientes con infección confirmada por CHIKV. Los pacientes confirmados tenían mayor probabilidad de tener artralgia en muñeca, rodilla y articulaciones metacarpofalángicas. Se obtuvieron dos combinaciones de manifestaciones clínicas para diferenciar entre fiebre chikungunya y enfermedad febril aguda indiferenciada. Se obtuvieron 20 secuencias del gen de la proteína E1 y 10 del gen de la proteína E2. Estas secuencias se agruparon en el linaje Asiático. Catorce muestras divergieron de las secuencias previamente reportadas. Los pacientes infectados con los virus divergentes mostraron un espectro más amplio de manifestaciones clínicas. **Conclusiones:** Se definió de manera completa las manifestaciones clínicas de la fiebre Chikungunya en pacientes del sudeste de México. Se demostró la co-circulación de diferentes cepas de CHIKV en el estado de Chiapas y sus relaciones filogenéticas con otros virus circulantes en América.



Dra. Ana María Rivas Estilla
Directora de Tesis

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

México, al igual que otros países de América, se encuentra en emergencia epidemiológica debido a la transmisión autóctona del virus Chikungunya (CHIKV). Esto es un problema de salud nacional, debido a que existen vectores competentes en 30 estados del país, no hay exposición previa del virus a la población mexicana, es un virus de ARN que presenta alta diversidad genética y la tasa de ataque llega hasta el 80%. Esto pone a nuestro país en riesgo de diseminación del virus con potenciales brotes resultantes que podrían colapsar los sistemas de atención de salud.

El virus Chikungunya se transmite por la picadura de mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* [1]. Provoca fiebre alta, dolor en las articulaciones, dolor de cabeza y muscular. Aunque rara vez provoca la muerte, el dolor en las articulaciones puede durar meses o años y en ocasiones convertirse en un dolor crónico y causa de discapacidad para algunas personas. No existe un tratamiento específico ni una vacuna disponible para prevenir la infección de este virus.

1.1 Epidemiología

Desde el 2004, el virus Chikungunya ha causado brotes masivos y sostenidos en Asia y África, donde más de 2 millones de personas han sido infectadas, con tasas de hasta 68% en ciertas áreas [2]. La alta tasa de infección puede generar una presión alta muy rápidamente sobre los sistemas de salud.

De acuerdo a la Organización Panamericana de la Salud (OPS), a la semana epidemiológica número 47 de 2017, se habían reportado 331,000 casos confirmados de fiebre Chikungunya. Estos distribuidos principalmente en América Latina y el Caribe [3]. En la figura 1 se observan los países afectados por la fiebre por CHIKV.



Figura 1. Transmisión autóctona de Chikungunya SE 49, 2013 – SE 50, 2017 [3].

A partir de abril de 2014 a diciembre 2014, se observó un aumento en los nuevos casos de fiebre Chikungunya en el Caribe Latino. En octubre de 2014 empezaron los casos en América Central y hubo tres picos de casos. Dos fueron en 2015, uno en enero y el otro en agosto. El tercero fue en enero de 2016. En febrero de 2015, los casos en el área Andina empezaron y terminaron en octubre de 2015. En marzo de 2016 se empezaron a presentar casos en el cono sur, siendo Brasil el principal país afectado. El brote terminó en enero de 2017 [3].

En México, el 7 de noviembre de 2014, el Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE) declaró en emergencia epidemiológica al estado de Chiapas, ante el primer caso de transmisión autóctona de enfermedad por CHIKV. Hasta el 4 de noviembre de 2017, se habían reportado más de 12, 500 casos confirmados [4]. Durante el 2014 se reportaron 155 casos. En el año 2015 fue cuando se observó el mayor número de casos confirmados de fiebre Chikungunya. Se reportó un total de 11,577 casos confirmados. Para el 2016, el número de casos reportados bajó considerablemente a 759. En el 2017, hasta la semana epidemiológica 36, se contaba con 24 casos confirmados [5].

En el 2014, el estado con mayor número de casos fue Chiapas con más de 130 casos. En el 2015, Veracruz fue el estado con mayor número de casos reportados, 2000 casos, seguido de Guerrero y Yucatán, con más de 1500 casos. En el 2016, los dos estados más afectados fueron Baja California Sur con más de 170 casos y Veracruz con más de 150 casos. En el año 2017 los estados con el mayor número de casos fueron Quintana Roo y Jalisco con 11 casos confirmados [5]. Esto puede observarse con detalle en la figura 2.

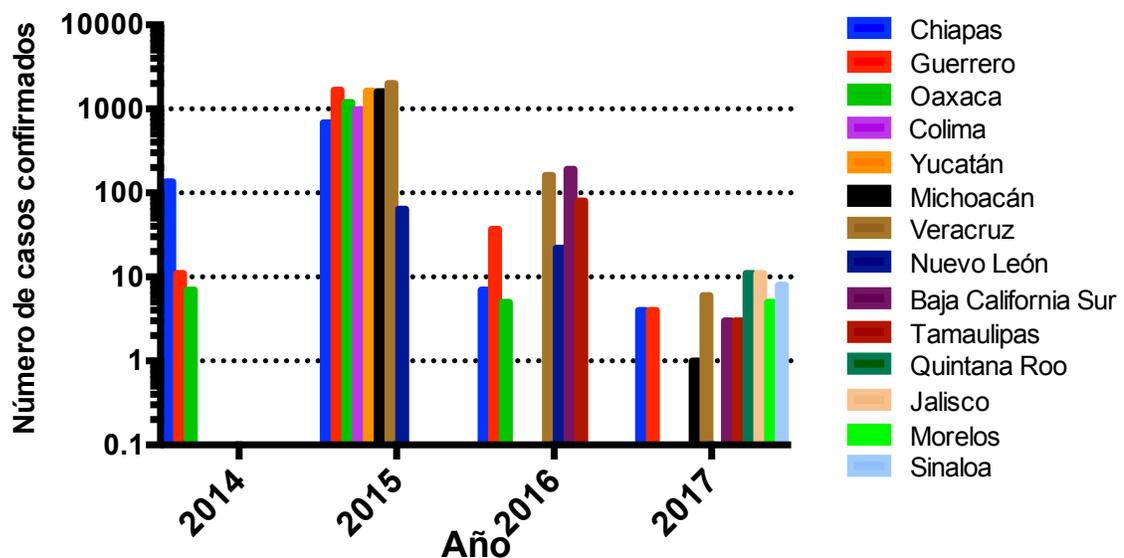


Figura 2. Estados de México con mayor número de casos de fiebre Chikungunya por año hasta la SE 36, 2017. Dirección General de Epidemiología [5].

1.2 Biología molecular del virus

El virus Chikungunya es miembro del género *Alfavirus* y su genoma consiste en ARN de cadena sencilla de polaridad positiva, de aproximadamente 12 kb de longitud [6]. El genoma codifica cuatro proteínas no estructurales que son responsables de la replicación del genoma viral y cinco proteínas estructurales codificadas en el extremo 3' del genoma, traducidas de un ARN mensajero subgenómico (figura 3) [1,7].

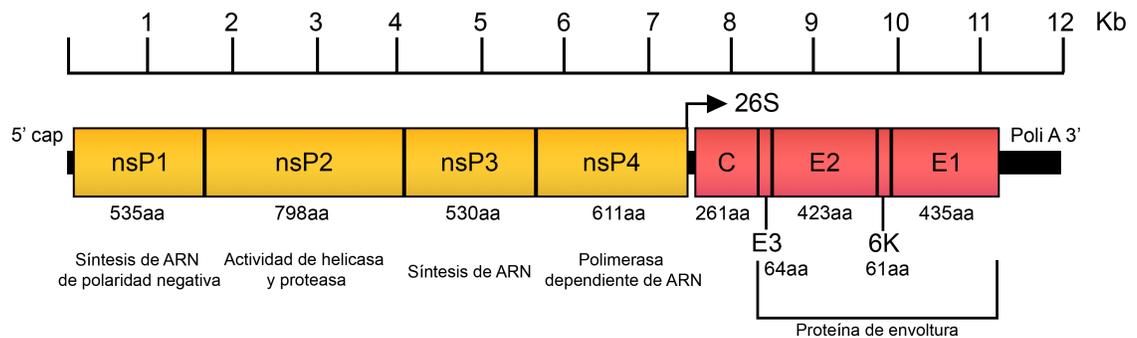


Figura 3. Distribución del genoma viral de CHIKV.

Los *Alfavirus* entran a las células blanco mediante endocitosis. Se han implicado algunos receptores en este proceso (DC-SIGN, L-SIGN, sulfato de heparán, laminina e integrinas) pero sus roles no se han probados claramente [8]. Recientemente la proteína prohibitina fue identificada como un receptor de CHIKV [9]. El ciclo viral de los *Alfavirus* se esquematiza en la figura 4. Después de la endocitosis, el microambiente ácido del endosoma desencadena cambios conformacionales en la envoltura viral, los cuales exponen al péptido E1, quien media la fusión de las membranas del virus y de la célula hospedera. Esto permite la liberación del genoma viral hacia el citoplasma [10]. Dos precursores de las proteínas no estructurales son traducidos a partir del ARN mensajero viral, los cuales son escindidos y generan las proteínas no estructurales 1 a 4 [7]. Estas proteínas se ensamblan y forman el complejo de replicación viral, el cual sintetiza un intermediario de ARN de cadena negativa el cual contiene el genoma viral completo. Éste sirve como molde para la síntesis de los ARN genómicos (46S) y subgenómicos (26S) [11]. El ARN subgenómico codifica al precursor de las proteínas estructurales (C-pE2-6K-E1), el cual es escindido por autoproteólisis. La cápside es

liberada y el procesamiento posterior genera las proteínas pE2 y E1. Las proteínas pE2 y E1 se asocian en el aparato de Golgi y son exportados a la membrana plasmática, donde pE2 es escindida a E2 y E3 [12]. La unión de la nucleocápside con el ARN genómico viral y el reclutamiento de las proteínas de envoltura asociadas a membrana, promueven el ensamblaje viral. Finalmente, la partícula de Alfavirus ensamblada brota de la membrana plasmática [11].

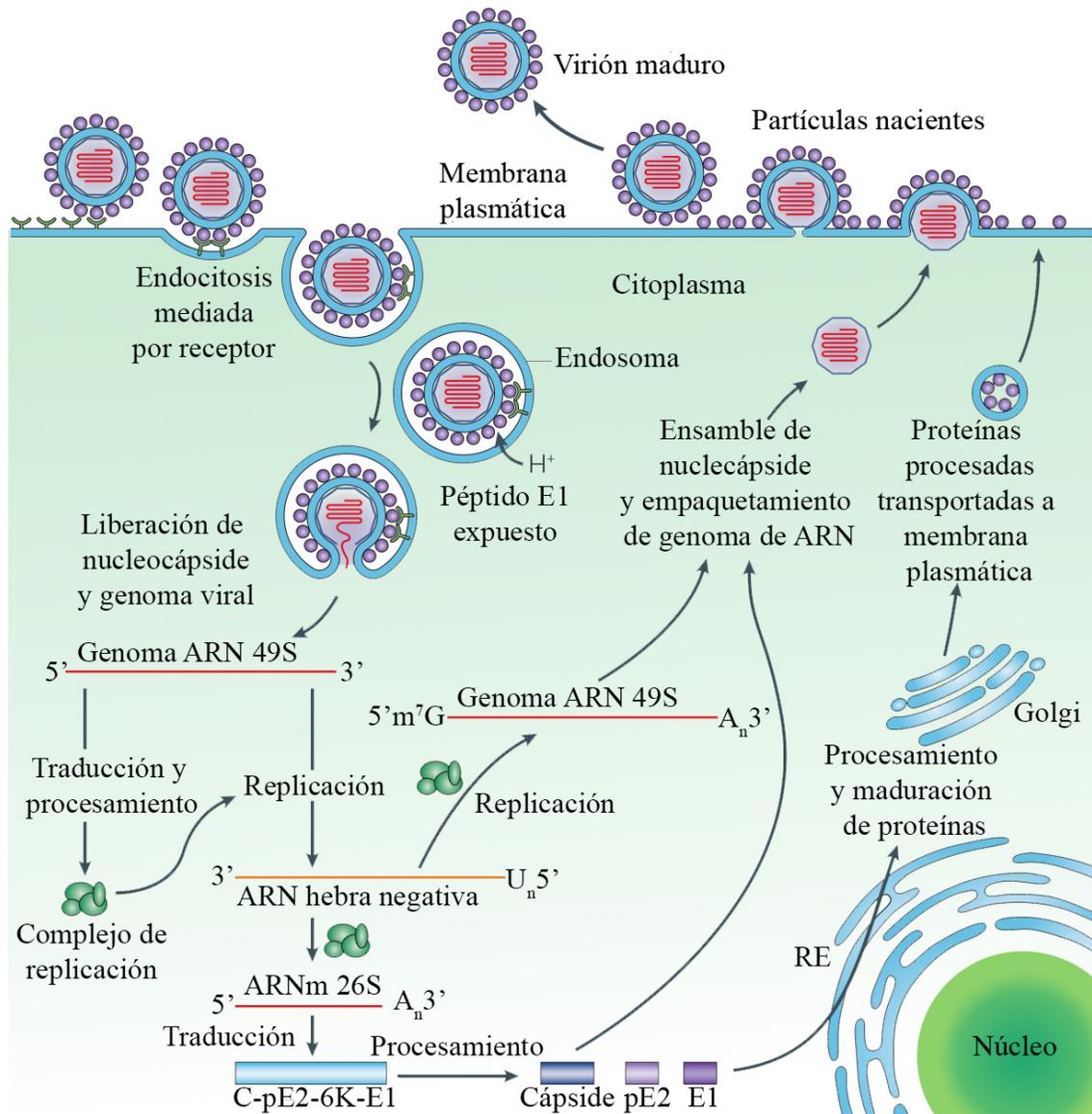


Figura 4. Ciclo de replicación viral de los Alfavirus. Adaptado de Schwartz [10].

1.3 Variabilidad Genética y filogenia

Existen cuatro linajes de CHIKV, cada uno con diferentes características genotípicas y antigénicas [13] (figura 5). Los primeros estudios filogenéticos revelaron que el CHIKV tuvo su origen en África, donde dos linajes circularon, el del Oeste de África y el Este/Centro/Sur de África (ECSA). Posteriormente el linaje ECSA se diseminó hacia Asia, dando origen al linaje Asiático [14]. El cuarto linaje se originó en la isla de La Reunión a partir del linaje ECSA en el 2006. Este linaje poseía mutaciones que permitían la adaptación del virus para infectar mosquitos *A. albopictus* con mayor facilidad, lo cual causó la posterior diseminación del virus por los países alrededor del Océano Índico, dándole así el nombre de linaje del Océano Índico [15]. El linaje al cual pertenece el virus que está causando la epidemia en América Latina, es el asiático. Sin embargo, en Brasil circula también el linaje ECSA, el cual fue introducido por un viajero que regresó de Angola [16].

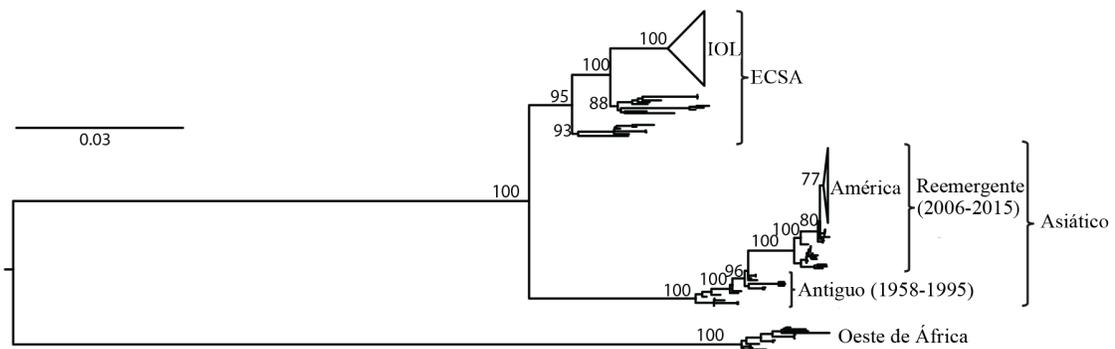


Figura 5. Reconstrucción filogenética de los diferentes linajes de CHIKV. Adaptado de Chen [17].

1.4 Manifestaciones clínicas

Después de un periodo de incubación de 2 a 6 días, la enfermedad inicia de forma abrupta con fiebre, cefalea, mialgias, exantema y artralgias. Las artralgias pueden ser incapacitantes y durar de semanas a meses (figura 6). Al contrario de otras enfermedades, la mayoría de las infecciones (85%) son sintomáticas [1,18,19]. La

intensidad de la infección se relaciona con la viremia, la cual puede durar hasta 7 días o hasta que aparezcan los anticuerpos IgM [1].

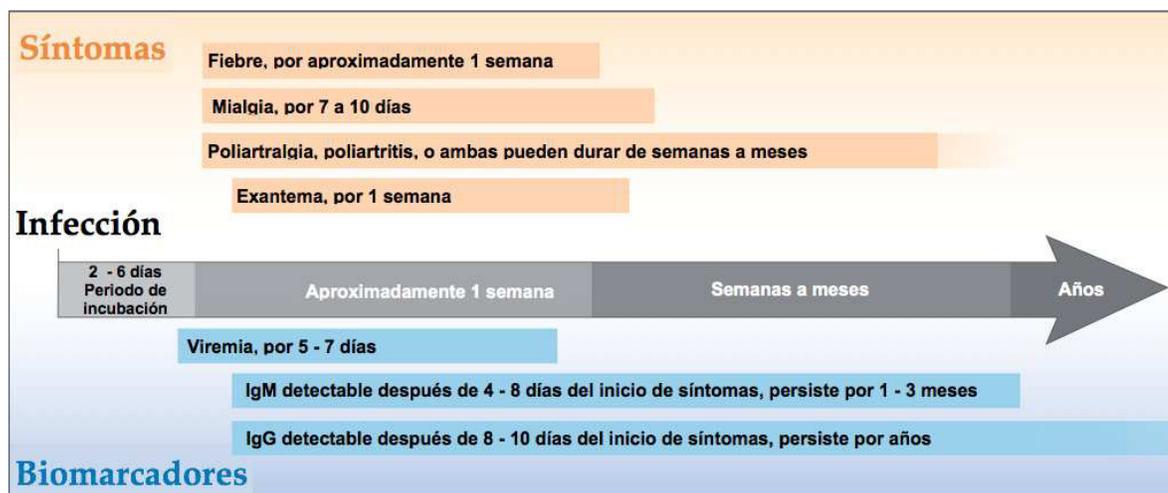


Figura 6. Historia natural de la fiebre Chikungunya. Adaptado de Weaver [1].

Las artralgiyas son generalmente simétricas, localizadas en miembros superiores e inferiores. En frecuencia de aparición, primero están las articulaciones de la mano, después las muñecas y luego los tobillos [20–22]. Aunque la mayoría de las infecciones se manifiestan con fiebre y artralgiyas, también puede haber manifestaciones atípicas [23]. Los pacientes con infección por Chikungunya severa tienden a ser adultos mayores y neonatos, quienes pueden llegar a perecer por complicaciones de otras comorbilidades [24].

1.5 Diagnóstico

La infección por CHIKV es diagnosticada en base a criterios clínicos, epidemiológicos y de laboratorio. Fiebre de inicio agudo y artralgia severa o artritis no explicada por otra condición es considerada como caso sospechoso de infección por CHIKV [13]. Existen tres tipos de pruebas de laboratorio: aislamiento viral, reacción en cadena de la polimerasa acoplado a transcriptasa reversa (RT-PCR) y serología [24].

El aislamiento viral puede ser realizado en mosquitos colectados o en suero (≤ 8 días). El suero obtenido durante la primera semana de la enfermedad puede ser inoculado en líneas celulares susceptibles o en ratones lactantes en laboratorios de referencia [24]. Han sido publicados varios ensayos de RT-PCR para la detección de ARN viral. Se prefiere utilizar un sistema cerrado de tiempo real debido a su mayor sensibilidad y menor riesgo de contaminación. Tomando en cuenta la sensibilidad, la OPS recomienda el uso de los protocolos del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) y el Instituto Pasteur [25,26]. Recientemente el CDC desarrolló el ensayo de PCR tiempo real Trioplex donde se detectan los virus CHIKV, DENV y ZIKV de manera simultánea [27]. La determinación de IgM puede ser determinada por diferentes técnicas comercialmente disponibles. Se debe tomar en cuenta que la mejor sensibilidad se obtiene cuando se utiliza como antígeno el virus completo, comparado con las proteínas recombinantes. El CDC, el Laboratorio Nacional de Microbiología de la Agencia de Salud Pública de Canadá y la Agencia de Salud Pública del Caribe (CARPHA) evaluaron los estuches comerciales para la detección de anticuerpos IgM específicos para el virus Chikungunya [28]. Los estuches se compararon contra el ELISA desarrollado por el CDC [29] y se determinó la concordancia. El estuche Euroimmun Anti-CHIKV IgM ELISA tuvo una concordancia $\geq 95\%$ en los resultados de los tres laboratorios de referencia. El estuche InBios CHIKjj *Detect* MAC-ELISA tuvo una concordancia de 100% y 98% en los resultados del CDC y CARPHA, respectivamente. El estuche Abcam Anti-CHIKV IgM ELISA tuvo un alto desempeño en los resultados de CARPHA, pero un pobre desempeño entre lotes cuando fue evaluado por el CDC. Las dos pruebas rápidas evaluadas, *On-site* CHIK IgM Combo Rapid Test y SD BIOLINE Chikungunya IgM, tuvieron una baja sensibilidad [28].

1.6 Tratamiento

No hay antiviral específico para el tratamiento de la infección por CHIKV. Tratamiento sintomático es indicado después de descartar infecciones más severas como paludismo, dengue o infecciones bacterianas [19]. En la infección aguda el tratamiento es sintomático y de soporte, compuesto de paracetamol para reducir la fiebre y descanso

en cama. El uso de ibuprofeno u otro antiinflamatorio no esteroideo (AINE) puede utilizarse después de descartar la infección por dengue [24].

Si bien la recuperación de infección por CHIKV es el resultado esperado, el tiempo de convalecencia puede ser prolongado y dolor articular persistente, puede requerir tratamiento prolongado. El tratamiento específico de la artralgia post-CHIKV en los estadios crónicos consiste en AINE orales o tópicos más un curso corto de corticoterapia oral o infiltración en la articulación afectada. El dolor neuropático puede ser tratado con antidepresivos tricíclicos, antiepilépticos o tramadol [30].

1.7 Prevención

Hasta que haya tratamiento o vacuna disponible, el control de CHIKV recae en la reducción del vector y la limitación del contacto entre humanos y mosquitos [31]. Debido a su comportamiento y su estrecha asociación con los humanos, la eliminación del principal vector *A. aegypti*, requiere del uso de métodos de control vectorial, manejo ambiental y manejo químico basado en la aplicación de larvicidas y adulticidas en espray. El control químico se debe de añadir al agua almacenada para uso doméstico, incluyendo el agua para beber. Desde 1970, el organofosforado temefos ha sido usado ampliamente, pero los niveles de resistencia han aumentado, así como el rechazo de la ciudadanía de tratar su agua para beber [32]. Los agentes de control biológico, incluyendo peces larvívoros y copéodos, han demostrado un rol en el control de *A. aegypti* pero dificultades operacionales han prevenido su amplio uso [33,34]. Asimismo se ha utilizado a la bacteria *Wolbachia* para detener la transmisión de virus transmitidos por *A. aegypti* [35,36]. El manejo ambiental es considerado un componente esencial para la prevención y el control del dengue, particularmente cuando se enfoca en los contenedores hábitat del vector. La reducción de los contenedores, campañas de descacharrización, limpieza y vaciamiento de contenedores, entra en el manejo ambiental.

Se han usado diferentes tecnologías para desarrollar vacunas contra CHIKV, incluyendo vacunas de virus inactivados, virus vivos atenuados, quimeras de Alfvirus, vacunas recombinantes, vacunas de ADN, vacunas de subunidades recombinantes y vacunas de partículas parecidas a virus (VLP). A la fecha hay dos candidatos de vacunas que terminaron la fase clínica uno: una vacuna viva recombinante basada en el virus del sarampión y una vacuna VLP. La vacuna recombinante demostró tener buena inmunogenicidad, a pesar de la inmunidad al sarampión presente en el paciente, ser segura y tener buena tolerabilidad [37]. La vacuna VLP, VRC-CHKVLP059-00-VP demostró también ser inmunogénica, segura y bien tolerada [38].

1.8 Patogénesis

La patogénesis de la infección por CHIKV en humanos es poco conocida, pero los brotes recientes, han ayudado a proporcionar conocimientos sobre las células y los órganos implicados en la replicación viral. Después de la inoculación intradérmica por mosquitos infectados, el CHIKV entra directamente a los capilares subcutáneos e infecta las células susceptibles en la piel: los macrófagos, fibroblastos y células endoteliales, donde ocurre replicación limitada [39]. Los virus producidos localmente son transportados a los órganos linfoides secundarios, donde infectan linfocitos y liberan los virus a la circulación linfática y posteriormente a la sangre [13]. Una vez en la sangre los virus tienen acceso a todos los órganos del cuerpo, incluyendo el hígado, músculo, articulaciones y cerebro [40]. En estos tejidos, la infección está asociada con una marcada infiltración de células mononucleares. Esta infiltración y la replicación viral en músculos y articulaciones está asociada con dolor [41,42]. En la figura 7 se resume de manera gráfica la patogénesis de la enfermedad.

La infección por CHIKV provoca respuestas innatas sistémicas poderosas, que implican principalmente la producción de IFN- α , así como muchas citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas y factores de crecimiento [43]. Esto es seguido por la activación de la inmunidad adaptativa, a través de la activación y proliferación de las células T CD8⁺ en las primeras etapas de la enfermedad. Un cambio en la respuesta de

células T CD4⁺ y la producción de proteínas anti-inflamatorias IL-1RA e IL-2RA caracterizan posteriores etapas de la fase aguda [43].

La infección por CHIKV induce una fuerte respuesta inflamatoria posiblemente orquestada por la producción de IL-16, IL-17, proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), IP-10, y MIP-1 α . El final de la fase aguda se caracteriza por la producción de MIF, MIP-1 β , SDF-1 α , y IL-6, IL-8 y CCL5 [43]. CCL5, MCP-1, IP-10, MIP-1 β e IL-8 que son producidas por los macrófagos activados susceptibles a la infección por CHIKV [39]. Estas citocinas desempeñan un papel importante en el reclutamiento de leucocitos a sitios de infección, coordinando el despliegue de defensas antivirales efectivas.

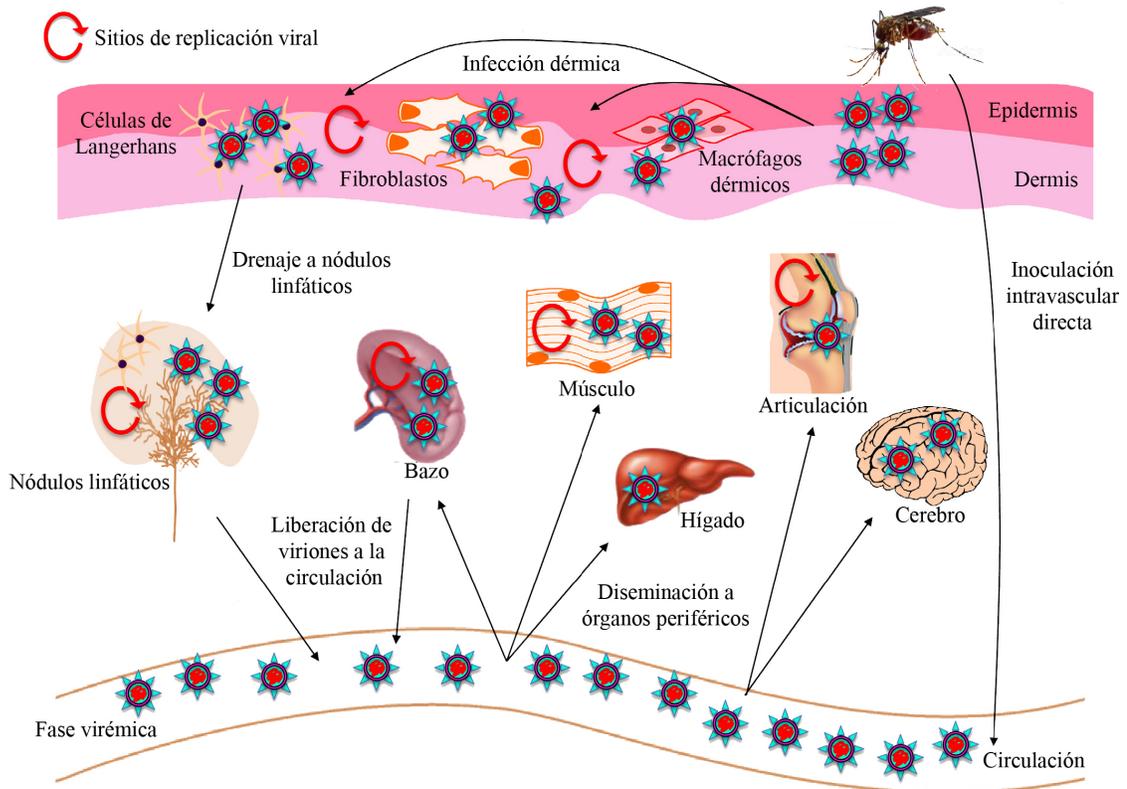


Figura 7. Patogénesis de CHIKV. Adaptado de Lum [44].

La infección por CHIKV también induce una fuerte respuesta inmune celular. Los niveles plasmáticos altos de IFN- γ , IL-4, IL-7 e IL-12p40, las cuales son citocinas que promueven la inmunidad adaptativa, sugieren la implicación de respuestas celulares [43]. Se ha sugerido un papel clave de las células NK en el aclaramiento de las células infectadas y en el desarrollo de la artralgia [45]. Las citocinas promotoras de células B, IL-4 y en algunos casos la IL-10, se sobreexpresan en los primeros días después del inicio de los síntomas, probablemente iniciando la producción de anticuerpos IgG específicos para CHIKV. Además, los linfocitos T CD4⁺, que también están implicadas en la producción de respuestas humorales, son fuertemente activados hacia el final de la fase aguda [43].

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Fiebre Chikungunya en México

Desde el inicio del brote en Chiapas, en octubre de 2014, la fiebre Chikungunya se describió como enfermedad febril con exantema y artralgia inusual [46]. No se describieron las manifestaciones clínicas, solo se hizo el diagnóstico molecular y se secuenció el genoma completo de los virus circulantes. Se identificó el mismo virus circulando en Ciudad Hidalgo, Tapachula y La Libertad (figura 8).

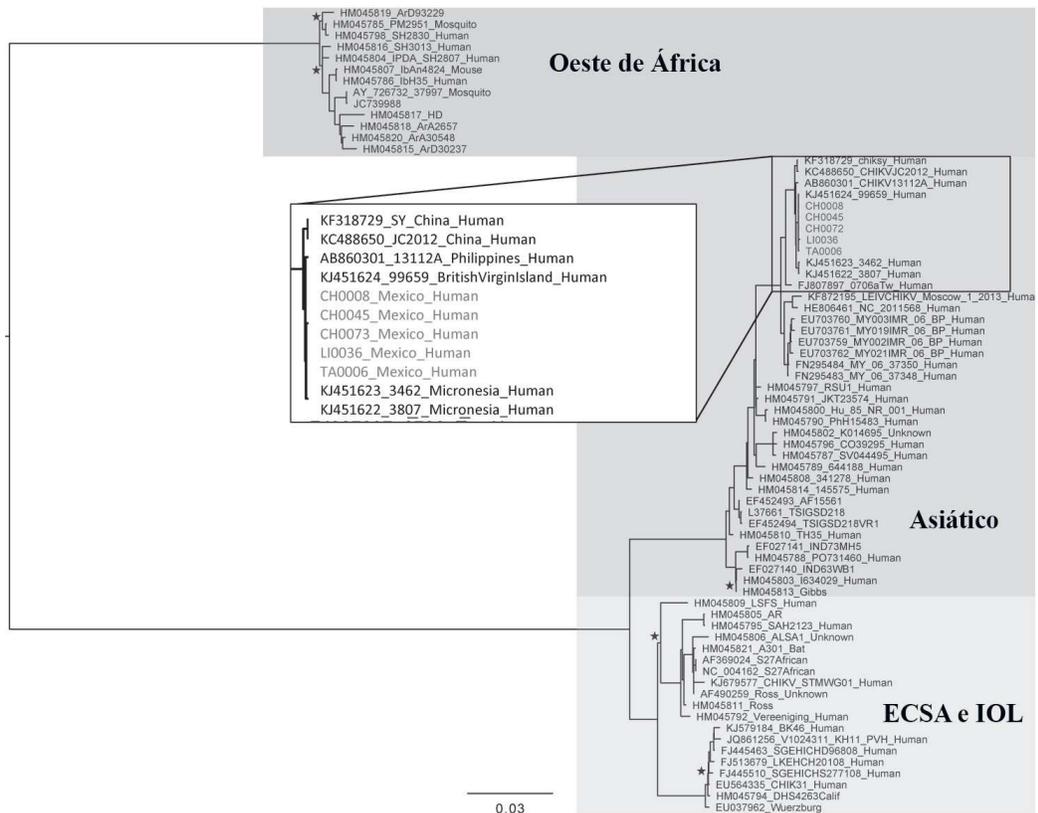


Figura 8. Árbol filogenético creado por análisis Bayesiano donde se muestra la relación de los aislados de México. Todos los nodos excepto los de la estrella tuvieron una probabilidad posterior mayor a 0.9. Adaptado de Kautz [46].

Un año después, Cigarroa-Toledo reportó la sintomatología presentada por 11 pacientes del estado de Yucatán. Todos reportaron artralgia, y mialgia. Los 11 pacientes reportaron artralgia en rodillas y muñecas. Se reportó también astenia (90%), exantema (46%) y vómito (9%) [47]. Además se secuenciaron los genes estructurales de los virus circulantes (figura 9).

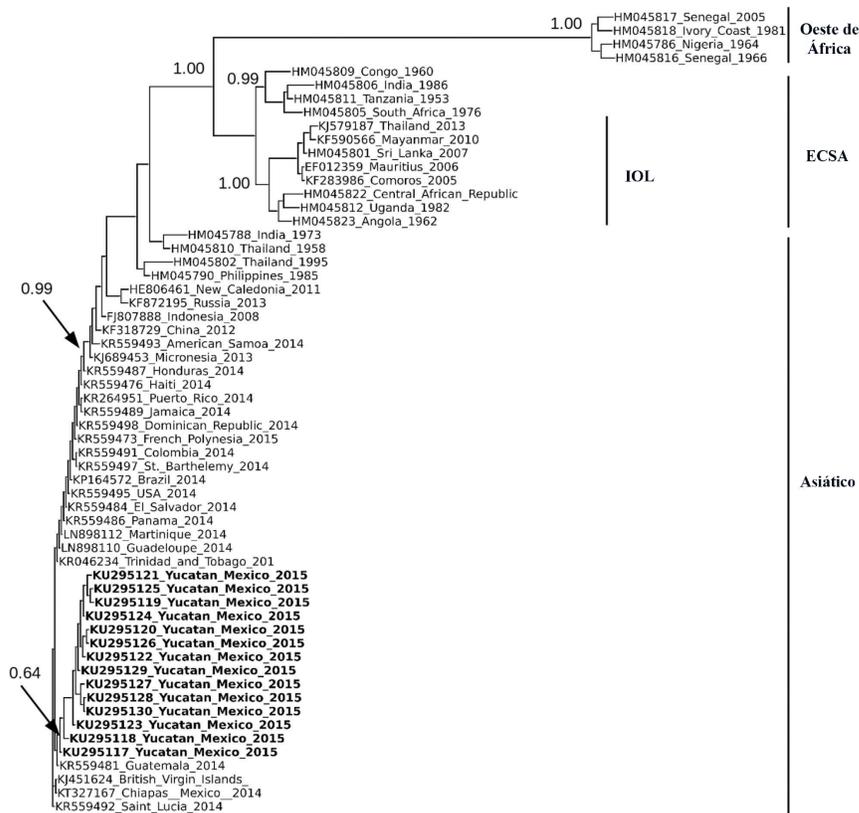


Figura 9. Árbol filogenético donde se muestra la relación de los aislados de Yucatán. Se utilizó un soporte de 1,000 réplicas y se normalizaron a una escala de 0 – 1. Adaptado de Cigarroa-Toledo [47].

Posteriormente, Garay-Morán reportó lo contenido en la base de datos de la Dirección General de Epidemiología, hasta la semana epidemiológica 40 de 2015 [48]. Su población de estudio fue de 8,668 casos confirmados. Sin embargo, la caracterización clínica es pobre. Evaluaron cefalea, mialgias, artralgias leves, poliartralgias graves, exantema, escalofríos, dolor retroorbitario y dolor de espalda. No

hace una descripción en cuanto a artralgias leves y poliartralgias graves. En este estudio se enfocaron solo en datos epidemiológicos (figura 10).

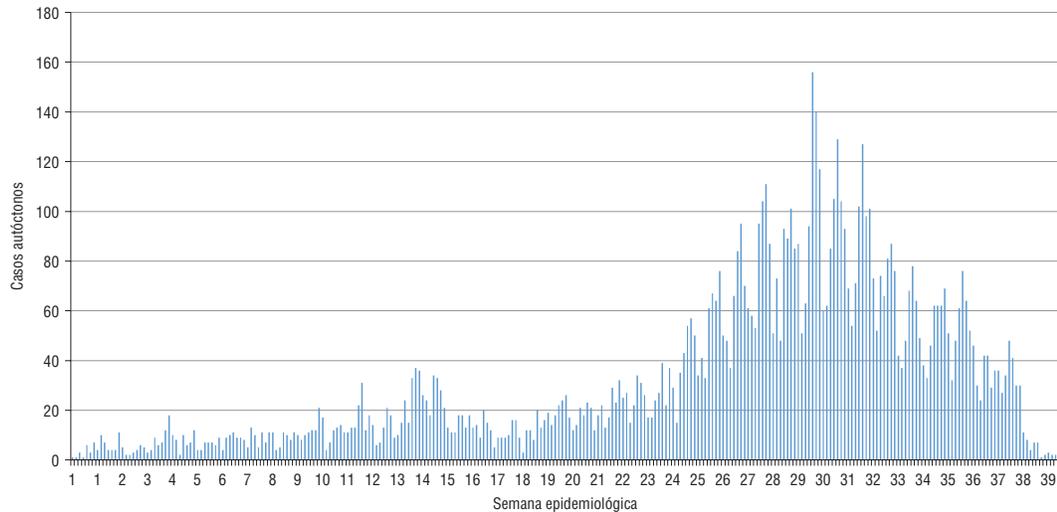


Figura 10. Curva epidémica de los casos autóctonos de fiebre Chikungunya en México. Semanas epidemiológicas 1 a 40, 2015. Adaptado de Garay-Morán [48].

Danis-Lozano en el 2017, reporta una caracterización clínica parcial de pacientes con infección aguda y convaleciente del estado de Chiapas (tabla 1) [49]. Su descripción no incluyó la localización de la artralgia, artritis y exantema. No evaluaron la cantidad de articulaciones afectadas, el dolor reportado por los pacientes, ni si los pacientes dependían de alguien para sus actividades diarias. Realizaron además, una extensa evaluación de parámetros de laboratorio, pero sus valores de referencia de las enzimas hepáticas distan de los valores de referencia mexicanos [50].

Tabla 1. Manifestaciones clínicas de los 95 casos virémicos y postvirémicos reportados por Danis-Lozano [49]

Manifestación clínica	qPCR+ n = 62		IgM + n = 33		Manifestación clínica	qPCR+ n = 62		IgM + n = 33	
Fiebre	62	100	33	100	Conjuntivitis	10	16	5	15
Cefalea	51	82	29	88	Congestión nasal	9	15	9	27
Mialgia	4	7	0	-	Tos	9	15	4	12
Poliartralgias	62	100	33	100	Faringitis	11	18	5	15
Artritis	36	58	26	79	Esplenomegalia	1	2	0	-
Dolor retroorbitario	9	15	3	9	Disgeusia	49	79	23	70
Exantema	51	82	27	82	Adenopatía	21	34	20	61
Prurito	41	66	26	79	Blefaritis	4	7	1	3
Vómito	11	18	1	3	Disnea	4	7	1	3
Náusea	44	71	16	49	Alteraciones cardíacas	1	2	0	-
Escalofríos	51	82	25	76	Debilidad muscular	15	24	5	15
Fotofobia	1	2	0	-	Petequias	0	-	1	3
Dolor abdominal	29	47	12	36	Edema	27	44	17	52
Diarrea	21	34	14	42	Hemorragia	3	5	2	6

Los valores en las columnas corresponden a: número y %, para los parámetros qPCR e IgM +, respectivamente.

Es por eso que decidimos extender las variables clínicas a estudiar, tomando en cuenta la localización de artralgia, artritis, y exantema. Además de la cantidad de dolor, y ayuda requerida por los pacientes. Se incluyó también la localización de los domicilios de los pacientes para realizar análisis espaciales. Conjuntamente se secuenciaron los genes E1 y E2 de los virus aislados.

2.2 Patogénesis del linaje asiático

La variación entre la patogénesis y la virulencia de los diferentes linajes de CHIKV no ha sido investigada a profundidad. Sin embargo, existen algunas comparaciones hechas en modelos murinos y en primates no humanos.

Uno de estos estudios compara los niveles de virulencia de los linajes asiático (MY/06/37348) e IOL (MY/08/065) aislados en Malasia [51]. En él, se inoculó de manera intracerebral a ratones lactantes y se realizó titulación viral, análisis histológico y de expresión génica de los cerebros. Ambos linajes se replicaron de manera similar. Sin embargo, los ratones infectados con el virus asiático tuvieron mayor mortalidad. El análisis histológico mostró que ambos linajes se distribuyeron a través del cerebro. Se observó apoptosis más temprana en los cerebros de los ratones infectados con el linaje asiático. El análisis de expresión génica demostró que el gen proapoptótico eIF2 α K2 fue sobreexpresado en mayor medida en los ratones infectados con el linaje asiático. De manera contraria, genes antiapoptóticos (BIRC3), de respuesta antiviral y neuroprotección, se encontraron sobreexpresados en mayor medida en los ratones infectados con el linaje IOL [51].

Gardner y colaboradores compararon las infecciones de dos diferentes linajes, IOL y asiático aislado en 1960, en ratones C57BL/6. Ellos encontraron menor infiltrado inflamatorio en las patas de los ratones infectados con el virus asiático, así como menor edema en la extremidad, y niveles menores de MCP-1, INF γ e INF α/β [52].

Existe un reporte en donde se muestra que el linaje asiático del Caribe, es menos patogénico que el linaje IOL en un modelo de CHIKV en ratón [53]. En esa investigación, utilizaron un virus aislado en el brote de Reunión, LR2006 OPY1, perteneciente al linaje IOL. Del linaje asiático utilizaron un virus aislado de un paciente de la isla de San Martín, en diciembre de 2013 (CNR20235). Primero infectaron fibroblastos de cola de ratón con los dos diferentes virus y observaron que los ratones inoculados con el virus de Reunión tenían mayor carga viral que el virus del Caribe a las 6 y 12 horas postinfección. Esto también se vio reflejado en el número de unidades formadoras de placa, que fue significativamente mayor cuando se infectaban las células Vero con el virus de Reunión.

Posteriormente, ellos mismos infectaron a ratones C57/BL6 con 10^6 unidades formadoras de placa de los dos virus en el cojinete plantar. Se evaluó la inflamación multiplicando el alto por el ancho de la pata y se calculó el grado de inflamación. Primero se restó la inflamación al día cero, a la inflamación actual. Posteriormente el resultado de esta resta, se dividió entre la inflamación del día cero. Se observó como el virus del linaje IOL causó mayor inflamación en la pata de los ratones (figura 11 A). Hubo una mayor carga viral del virus de Reunión en los primeros dos días. Además hubo mayor edema en los cortes histológicos de la pata de ratones infectados con el virus IOL (figura 11 B). Asimismo se encontró una mayor permeabilidad vascular por medio de un trazador y un sistema de imagen *in vivo* en los ratones que fueron infectados con el virus de Reunión.

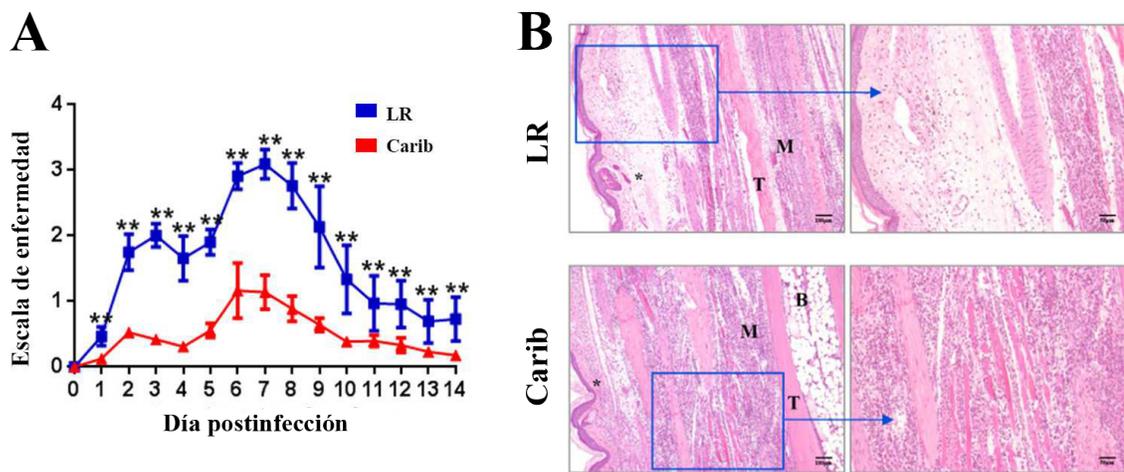


Figura 11. Diferentes desenlaces patológicos inducidos por virus de Reunión y el Caribe en ratones. A) Severidad de la enfermedad de acuerdo a la inflamación de la pata del ratón. B) Análisis histológico de pata infectada, 6 días postinfección. Tinción H&E. LR, Reunión; Carib, Caribe; *, edema; B, hueso; M, músculo; T, tendón. Adaptado de Teo [53].

Un estudio reciente demostró que los diferentes linajes de CHIKV producen diferente mortalidad en ratones A129 [54]. Se infectaron ratones que tienen deficiente la señalización de IFN tipo I, $IFN\alpha R^{-/-}$, en el cojinete plantar con 10^4 UFP de al menos dos virus representativos para cada linaje. Se evaluó sobrevida, pérdida de peso y carga viral a los diferentes días post infección. Todos los ratones infectados con el linaje del

oeste de África murieron al día 4 postinfección. Los ratones infectados con el linaje IOL y ECSA murieron a los días 4 y 5, respectivamente. Los ratones infectados con el linaje asiático murieron al día 5, mientras que los infectados con el sublinaje americano sobrevivieron hasta el día 6. Las cepas del oeste de África indujeron un desplazamiento significativo a la izquierda en la curva de sobrevida. Los ratones infectados con las cepas americanas, tuvieron una sobrevida significativamente mayor que los ratones infectados con los linajes del oeste de África (figura 12 A).

Los virus del linaje del oeste de África tuvieron una viremia significativamente mayor que los virus del linaje IOL y ECSA en el día 1 y significativamente mayores que los linajes ECSA, IOL y asiático/americano en el día 2. No se observó diferencia en el cambio de peso en los ratones de los diferentes grupos. Sí se encontró diferencia significativa en la inflamación del cojinete plantar de los días 2 a 6 (figura 12 B).

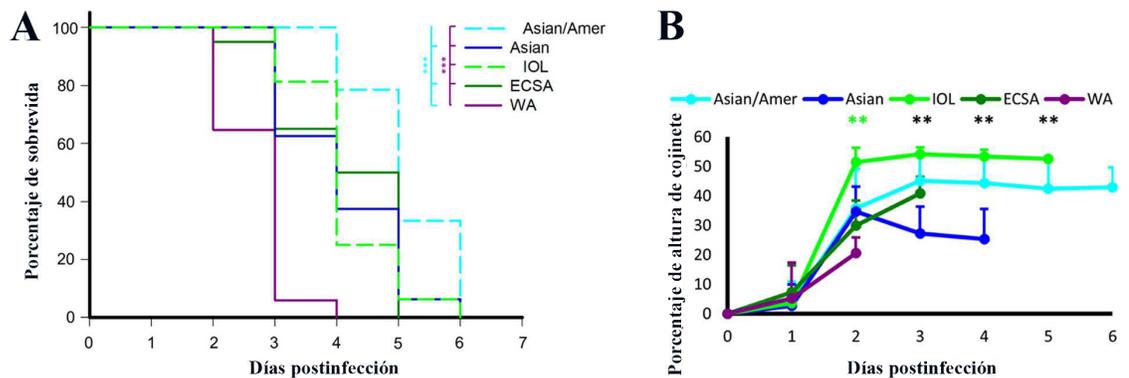


Figura 12. Sobrevida e inflamación de ratones A129 infectados con diferentes linajes de CHIKV. A) Análisis de sobrevida. B) Inflamación del cojinete plantar. Asian/Amer, linaje asiático/americano; Asian, linaje asiático; IOL, linaje Océano Índico; ECSA, linaje este/sur/centro de África; WA, linaje oeste de África. Prueba de Mantel-Cox, *** $p < 0.005$; ANOVA de una vía, ** $p < 0.05$. Adaptado de Langsjoen [54].

Es por esto, que resulta interesante investigar si los pacientes mexicanos infectados con el linaje asiático/americano tienen sintomatología igual que los pacientes infectados con el virus IOL o ECSA.

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN

Existen reportes epidemiológicos de la fiebre Chikungunya. Sin embargo, la descripción clínica es limitada y se requiere una mayor descripción para la mejor atención de los pacientes.

Además, es limitada la información de las variantes genéticas del CHIKV, su comportamiento, los mecanismos evolutivos y su asociación con el espectro de manifestaciones clínicas en diferentes regiones de México.

Por lo tanto es importante generar conocimiento científico para facilitar el entendimiento de la fisiopatogenia de esta enfermedad y el desarrollo de nuevas estrategias de control para disminuir la transmisión del virus.

CAPÍTULO 4

OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Describir la presentación clínica y epidemiológica de la infección por el virus Chikungunya (CHIKV), identificación de virus circulantes y filogenia en pacientes provenientes de zonas vulnerables a la infección en México.

4.2 Objetivos específicos

1. Identificar la presentación clínica de casos positivos de fiebre Chikungunya en pacientes mexicanos.
2. Buscar marcadores clínicos que nos ayuden a diagnosticar fiebre Chikungunya de manera temprana.
3. Evaluar si existe daño hepático en pacientes con fiebre Chikungunya.
4. Conocer la relación filogenética entre las variantes de los virus Chikungunya circulantes.
5. Relacionar las variantes del virus con las manifestaciones clínicas presentadas por los pacientes.

CAPÍTULO 5

METODOLOGÍA

5.1 Estrategia experimental

El diseño metodológico del siguiente estudio fue observacional, transversal, descriptivo, no ciego.

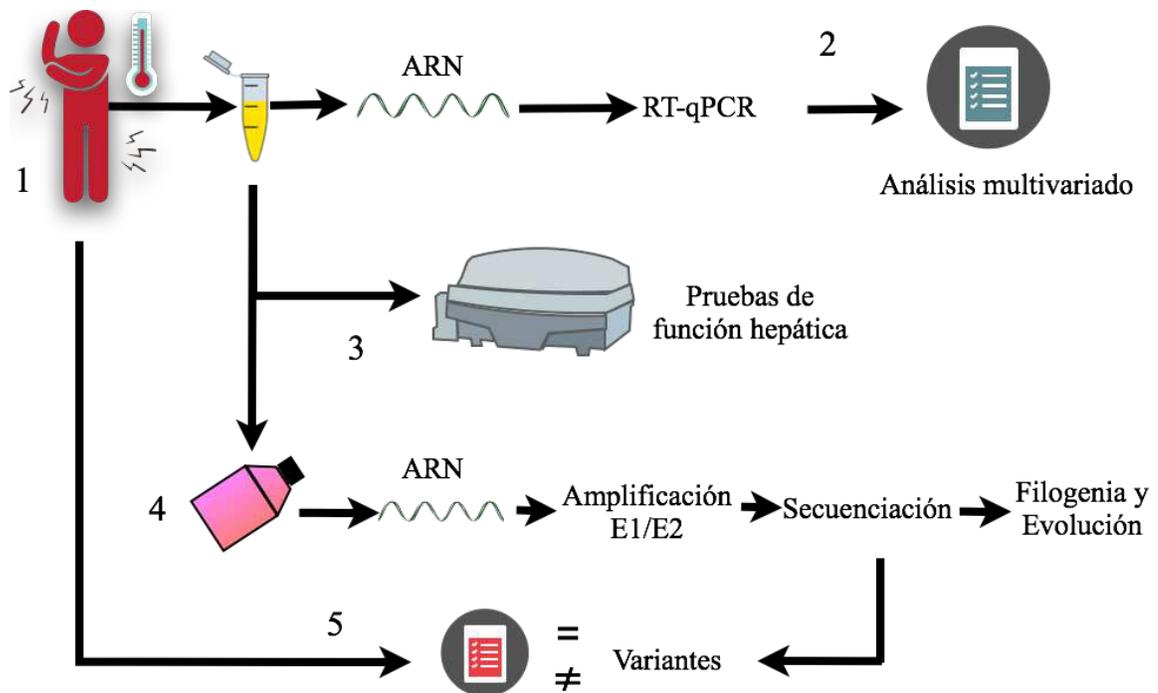


Figura 13. Estrategia general para abordar objetivos planteados.

5.2 Identificación de casos

Un caso sospechoso de fiebre Chikungunya (CHIKF), de acuerdo a los lineamientos de la Secretaría de Salud es todo paciente con: temperatura corporal $>37.5^{\circ}\text{C}$, más poliartalgias severas o artritis de comienzo agudo, alguna asociación epidemiológica y que tengan un máximo de 7 días de evolución. La asociación epidemiológica consiste en: presencia del vector *Aedes aegypti* o *Aedes albopictus*;

antecedente de visita o residencia en áreas de transmisión en las dos semanas previas al inicio del cuadro clínico; y existencia de casos confirmados en la localidad.

Se acudió a la Clínica Hospital “Dr. Roberto Nettel Flores” del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) en Tapachula, Chiapas. El periodo en el que se hizo la identificación de los casos fue del 22 de junio al 3 de julio de 2015.

Todo paciente que acudió a consulta médica fue evaluado por los médicos de urgencias. Posteriormente los pacientes fueron evaluados clínicamente si presentaron caso sospechoso de fiebre por Chikungunya y eran mayores de 18 años. Se realizó historia clínica completa, así como exploración física intencionada. Se evaluaron los datos demográficos, comorbilidades, y sintomatología. Dentro de los datos demográficos se recabó: edad, género y domicilio. Las comorbilidades estudiadas fueron: hipertensión, diabetes, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, falla renal crónica, obesidad, dislipidemia, accidente cerebro vascular y epilepsia.

Se estudió la presencia de fiebre, su duración y síntomas relacionados como escalofríos y malestar general. La artralgia fue evaluada como simétrica o asimétrica y se dividió en miembros superiores, inferiores y otras. Se consideraron articulaciones del miembro superior las interfalángicas, metacarpofalángicas, carpometacarpianas, codo y glenohumeral. Las articulaciones del miembro inferior a estudiar fueron: coxofemoral, rodilla, tobillo, metatarso e interfalángicas. Asimismo se estudiaron las articulaciones: esternoclavicular, temporomandibular, cervicales, dorsales y lumbares. Se evaluó la presencia de inflamación y edema de las articulaciones de miembros superiores e inferiores.

Los signos mucocutáneos a evaluar fueron: exantema difuso o no, localizado en cara, cuello, torso, brazos, antebrazos, manos, abdomen, muslo, piernas y pies. Se evaluó la presencia de vesículas, prurito, e hiperestesia. Se evaluaron síntomas gastrointestinales como diarrea, náusea, vómito, dolor abdominal, anorexia y disgeusia.

Los síntomas neurológicos evaluados fueron: delirio, mareo, convulsiones, alteraciones en el estado de consciencia. Los síntomas hemorrágicos tomados en cuenta fueron: púrpura, gingivorragia, hematemesis, hemoptisis, hematuria y melena. Se evaluó también la presencia de cefalea, dolor retroorbitario, astenia y adenopatías.

Además se evaluó la cantidad del dolor utilizando la Escala Visual Análoga. Preguntando a los pacientes la cantidad del dolor yendo desde cero, sin dolor, hasta diez, dolor incapacitante y el más fuerte de su vida. Asimismo se evaluó el grado de asistencia de los familiares hacia los pacientes tomando en cuenta si ha necesitado ayuda en los siguientes casos: caminar, levantarse, bañarse, vestirse y/o comer.

Para evaluar si existían casos crónicos de CHIKF en la población mexicana, se contactaron a los pacientes de manera telefónica 14 meses después de la primera consulta. En esta segunda entrevista, se cuestionó sobre la duración del dolor o en su defecto su resolución. Además de las articulaciones afectadas por artralgia y artritis.

5.3 Toma de muestra sanguínea y separación

Se obtuvo una muestra sanguínea de 5 mL para obtener suero. La toma de muestra se realizó de forma aséptica como lo dicta la Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012. La toma de muestra de sangre para obtener suero fue realizada en un tubo rojo, sin anticoagulante. Los residuos generados en este y todos los demás procedimientos fueron desechados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Arbovirología y Control de Vectores del Centro Regional de Investigación en Salud Pública, perteneciente al Instituto Nacional de Salud Pública, en Tapachula, Chiapas. La muestra de sangre se reposó por 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se refrigeró a 4°C hasta su separación. El suero se separó en alícuotas en cabina de seguridad biológica clase II A y posteriormente éstas se almacenaron a -70°C.

5.4 Detección de anticuerpos contra CHIKV

Se utilizó la prueba de ELISA CHIKjj *Detect* para detectar anticuerpos IgM contra CHIKV desarrollada por Erasmus [55] y distribuida por InBios (Seattle, WA, EUA). Se siguieron las instrucciones del fabricante. De manera resumida, las muestras y controles se diluyeron 1:100 en solución de dilución. Se colocaron 50 µL de controles y muestras en la placa de 96 pozos por duplicado. La placa se incubó a 37°C por 30 min. La placa se lavó seis veces con solución de lavado 1X. Posteriormente se agregaron 50 µL de antígeno de CHIKV a cada pozo. Después la placa fue incubada nuevamente a 37°C por 30 min y se lavó como se describió anteriormente. Se añadieron 50 µL de conjugado a cada pozo, se incubó a 37°C por 30 min y se realizaron los lavados correspondientes. Se agregaron 75 µL de sustrato TMB y la placa se incubó 10 min en la oscuridad. Posteriormente se agregaron 50 µL de solución de paro. La absorbancia fue leída a 450 nm.

Para la interpretación de los resultados se calculó la media de la absorbancia de los calibradores. Se obtuvo el valor índice dividiendo la absorbancia de la muestra entre el punto de corte. Valores índice menores a 0.9 indicaron un resultado negativo. De 0.9 a 0.99 el resultado de la prueba se consideró como dudosa. Solamente valores índice mayores a 1.0 fueron considerados positivos.

5.5 Detección de anticuerpos contra DENV

Utilizamos la prueba de ELISA específica para la proteína de envoltura de los virus Dengue 1 y 2 diseñada por el Dr. Román Vidaltamayo [56]. Las muestras de suero fueron diluidas 1:100 en PBS estéril y se corrieron por triplicado. Se utilizó el reactivo QuantaBlu Fluorogenic Peroxidase Substrate kit (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, EUA). Las placas de ELISA fueron leídas en el GloMax Discover System (Promega, Madison, WI, EUA).

5.6 Extracción de ARN

Se extrajo ARN a partir de 140 μ L de suero con el kit QIAamp Viral RNA Mini (QIAGEN, Valencia, CA, EUA). La extracción fue realizada de acuerdo a las indicaciones del fabricante. A continuación se mencionará el procedimiento realizado. Se partió de un tubo de 1.5 mL con 560 μ L de amortiguador AVL con acarreador de ARN. Se agregaron 140 μ L de suero, se mezcló por 15 s y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Terminada la incubación, se agregaron 560 μ L de etanol 100% y se mezcló por 15 s. Se vertieron 630 μ L de la mezcla a la columna QIAamp Mini y se centrifugó a 6000 x g por 1 min. Al terminar la centrifugación, se desechó el tubo colector y se colocó uno nuevo. Se vertió el volumen de mezcla restante en la columna y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Posteriormente se agregaron 500 μ L de amortiguador de lavado AW1 y se centrifugaron las columnas a 6,000 x g por 1 min. Se descartó el tubo colector y se utilizó uno nuevo para después añadir 500 μ L de amortiguador AW2. Esta vez la centrifugación fue a 20,000 x g por 3 min. Se descartó el tubo colector y la columna se colocó en un tubo de 1.5 mL donde el ARN se eluyó con 60 μ L de amortiguador AVE posterior a una centrifugación a 6,000 x g por 1 min. El ARN extraído se almacenó a -80°C.

5.7 Detección de ARN viral por medio de PCR

5.7.1 Detección de CHIKV por medio de RT-qPCR

Para la detección de ARN viral de CHIKV se utilizó el protocolo de RT-qPCR publicado por Lanciotti [26] recomendado por las Guías del CDC y OPS, dónde los iniciadores amplifican un fragmento de la proteína no estructural 4 del CHIKV. Para llevar a cabo las reacciones, se utilizó el kit de Super Script III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

Tabla 2. Secuencias de iniciadores y sonda de Lanciotti para detectar CHIKV

Iniciador	Secuencia 5' – 3'	Posición	Fluoróforo
6856	TCACTCCCTGTTGGACTTGATAGA	6856– 6879	
6981	TTGACGAACAGAGTTAGGAACATACC	6981– 6956	
6919-FAM	AGGTACGCGCTTCAAGTTCGGCG	6919-6941	FAM/BHQ1

Tabla 3. Condiciones de reacción de RT-qPCR para detectar CHIKV

Reactivo	Volumen (µL)
PCR Master mix 2X	12.5
Iniciador 6856 10 µM	0.5
Iniciador 6981 10 µM	0.5
Sonda 6919 5 µM	0.45
Mezcla SuperScript III RT/Platinum Taq	0.5
Agua libre de nucleasas	5.55
ARN	5
Volumen total	25

Las reacciones fueron llevadas a cabo en placas de 96 pozos y puestas en un termociclador ABI 7500 FAST (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). Los parámetros de temperaturas utilizados se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Programa de temperaturas de la RT-qPCR para detectar CHIKV

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	50	30 min
2	95	2 min
3	95	15 s
4	60	1 min
5	45 ciclos desde 3	

Una muestra se consideró positiva si obtuvo un CT menor a 37. Las muestras negativas fueron evaluados por el protocolo publicado por Seah [57] para detectar virus del Dengue y por el protocolo de Lanciotti para detectar virus Zika [58].

5.7.2 Detección de DENV por medio de RT-PCR

Se detectó ARN viral por medio de la técnica de PCR anidada reportada por Seah y colaboradores [57]. El protocolo consiste en amplificar un fragmento del gen NS3 del virus del dengue con un par de iniciadores en común para los cuatro serotipos. Posteriormente se amplifica una región específica utilizando el iniciador delantero común y un iniciador reverso específico para cada serotipo, empleando el producto de la PCR anterior. Para esta PCR se utilizó la transcriptasa inversa ImProm-II (Promega) y la polimerasa GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega). Los iniciadores utilizados se presentan en la tabla 5. La mezcla de las dos reacciones se muestran en la tabla 6. El programa de temperaturas se expone en la tabla 7.

Tabla 5. Secuencia de iniciadores utilizados en la PCR

Iniciador	Secuencia 5' – 3'	Tamaño amplificado (pb)
DV1	GGRACKTCAGGWTCTCC	-
DV3	AARTGIGCYTCRTCCAT	470
DSP1	AGTTTCTTTTCCTAAACACCTCG	169
DSP2	CCGGTGTGCTCRGCTGAT	362
DSP3	TTAGAGTYCTTAAGCGTCTCTTG	265
DSP4	CCTGGTTGATGACAAAAGTCTTG	420

I= inosina; K= G/T; R= A/G; W= A/T; Y=C/T

Tabla 6. Condiciones de reacción de PCR

PCR 1		PCR 2	
Reactivo	Volumen (µL)	Reactivo	Volumen (µL)
Buffer PCR 5X	2.3	Buffer PCR 5X	2.3
MgCl ₂ 25 mM	2	MgCl ₂ 25 mM	2

dNTP 10 mM	0.2	dNTP 10 mM	0.2
DTT 0.1 M	1.2	Iniciador DV1 10 μ M	0.5
Iniciador DV1 10 μ M	0.5	Iniciador DSP1 10 μ M	0.5
Iniciador DV3 10 μ M	0.5	Iniciador DSP2 10 μ M	0.5
RT-ImProm II	0.1	Iniciador DSP3 10 μ M	0.5
GoTaq Flexi	0.15	Iniciador DSP4 10 μ M	0.5
Agua MiliQ	15.55	GoTaq Flexi	0.15
ARN	2.5	Agua MiliQ	15.35
Volumen total	25	ADN 1:25	2.5
		Volumen total	25

Tabla 7. Programas de temperatura PCR

PCR 1			PCR 2		
Paso	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo	Paso	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo
1	42	1 h	1	94	30 s
2	94	30 s	2	55	1 min
3	55	1 min	3	72	2 min
4	72	2 min	4	25 ciclos desde 1	
5	25 ciclos desde 2		5	72	10 min
6	72	10 min	6	4	-
7	4	-			

Los productos amplificados fueron verificados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1X. El gel fue teñido con SYBR Safe (Invitrogen) y se utilizó el marcador EZ Load 100 bp Molecular Ruler (Biorad, Hercules, CA, EUA). Los geles fueron corridos a 100 V en buffer TBE 1X hasta que el colorante de carga llegó al final del gel. El gel fue examinado bajo luz UV.

5.7.3 Detección de ZIKV por medio de RT-qPCR

Para detectar ARN viral del virus Zika se utilizó la RT-qPCR diseñada por Lanciotti que amplifica una fracción de la proteína de envoltura [58]. Se utilizaron los

iniciadores con mayor sensibilidad. Los reactivos y termociclador utilizados fueron los mismos que se usaron para detectar CHIKV. Los iniciadores, reactivos y tiempos de ciclado se detallan en las tablas 8, 9, y 10.

Tabla 8. Secuencias de iniciadores y sonda de Lanciotti para detectar ZIKV

Iniciador	Secuencia 5' – 3'	Posición	Fluoróforo
1086	CCGCTGCCCAACACAAG	1086–1102	
1162c	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT	1162–1139	
1107-FAM	AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACTCAA	107–1137	FAM/BHQ1

Tabla 9. Condiciones de reacción de RT-qPCR para detectar ZIKV

Reactivo	Volumen (µL)
PCR Master mix 2X	12.5
Iniciador 1086 10 µM	0.5
Iniciador 1162c 10 µM	0.5
Sonda 1107 4 µM	0.45
Mezcla SuperScript III RT/Platinum Taq	0.5
Agua libre de nucleasas	5.55
ARN	5
Volumen total	25

Tabla 10. Programa de temperaturas de la RT-qPCR para detectar ZIKV

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	50	30 min
2	95	2 min
3	95	15 s
4	60	1 min
5	45 ciclos desde 3	

5.8 Definición de grupos a estudiar

Aquellos pacientes que fueron positivos para CHIKF por medio de RT-qPCR o ELISA IgM se les denominó CHIKV+. Se formaron dos grupos de pacientes positivos para CHIKF: los pacientes positivos por RT-qPCR se reunieron en el grupo RT-qPCR y los pacientes positivos por ELISA IgM se reunieron en el grupo IgM. Los pacientes que fueron negativos a las dos pruebas de CHIKV, RT-qPCR para ZIKV, RT-PCR para DENV y ELISA IgM contra DENV se reunieron en el grupo denominado enfermedad febril aguda indiferenciada (EFAI).

5.9 Georreferenciación de casos positivos para CHIKF

Se buscaron los domicilios de los pacientes en la página de Google Maps (maps.google.com) para obtener la latitud y longitud de la dirección. Posteriormente las coordenadas fueron ingresadas en ArcMap v10.2 (ESRI, Redlands, CA, EUA) para obtener las coordenadas en metros. Las coordenadas fueron asociadas a los pacientes y se desplegaron en el mapa del estado de Chiapas y la ciudad de Tapachula.

Se esquematizaron las diferentes distancias de vuelo de los mosquitos *A. aegypti* y *A. albopictus* a partir de los casos confirmados de CHIKF. Se realizaron círculos concéntricos con diámetros de 100 a 400 m. Si los círculos concéntricos de 100 o 200 m de diferentes casos se traslapaban se clasificó como un grupo de infecciones.

5.10 Determinación de pruebas de función hepática

Se realizaron pruebas de función hepática a muestras de pacientes con CHIKF confirmada por ELISA y RT-qPCR. Se utilizaron 500 μ L de suero, el cual posteriormente fue introducido al equipo ILab Aries (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, EUA). Se determinaron los siguientes analitos: fosfatasa alcalina (ALP), alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), γ -glutamil

transferasa (GGT), bilirrubina directa (BD), bilirrubina total (BT) y colesterol total (CHOL). Los valores normales que se tomaron en cuenta se enlistan en la tabla 11.

Tabla 11. Valores normales de las pruebas de función hepática

Analito	Valor normal	Unidades	Analito	Valor normal	Unidades
ALP M	33 – 98	U/L	GGT M	< 30	U/L
ALP H	43 – 115	U/L	GGT H	< 50	U/L
ALT M	< 31	U/L	BT	0.3 – 1.2	mg/dL
ALT H	< 41	U/L	BD	0.0 – 0.3	mg/dL
AST M	< 31	U/L	Chol	140 – 200	mg/dL
AST H	< 37	U/L			

ALP, fosfatasa alcalina; ALT, alanina aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa; GGT, γ -glutamyl transferasa; BT, bilirrubina total; BD, bilirrubina directa; Chol, colesterol; M, mujer; H, hombre

5.11 Cultivo de células C6/36

La línea celular C6/36 es una clona obtenida de la línea original de *A. albopictus* que presenta una alta sensibilidad a los virus del dengue. Las células C6/36 se mantuvieron en botellas de 25 cm² con 5 mL de medio Leibovitz L-15 suplementado con suero bovino fetal al 5%, aminoácidos no esenciales y anfotericina B, a 28°C sin atmósfera de CO₂. Se hizo pasaje de células cada semana. Las células se desprendieron de la botella por agitación.

5.12 Infección células C6/36 y cosecha viral

Se golpeó ligeramente la botella de cultivo para eliminar las células no adheridas. Posteriormente se decantó el medio de cultivo y se agregaron 5mL de medio L-15 + SBF 5% fresco. Se golpeó nuevamente la botella para desprender las células adheridas. Se realizó dilución 1:10 de las células para sembrar en tubos de cultivo celular Nunc de 3 mL (Thermo Scientific). Se incubaron los tubos a 28°C por 2 días y se descartó el medio. Se agregó 1 mL de medio L-15 + SBF 2% a cada uno de los tubos para posteriormente

colocar 10 μ L de suero de paciente en el borde del tubo. Se mezcló por inversión y se incubó a 37°C por 1 h. Al terminar la incubación se agregaron 2 mL de medio L-15 + SBF 2% y se incubaron a 28°C por 15 días. Las células fueron evaluadas constantemente bajo un invertoscopio. Se buscó intencionadamente: cambios en la morfología celular, formación de sincitios, vacuolización y lisis celular. Al día 15 de incubación, las células fueron desprendidas mecánicamente con una pipeta serológica y se hicieron alícuotas de la cosecha. Éstas fueron almacenadas a -80°C.

5.13 Amplificación del gen de envoltura viral 1 y 2

A partir del ARN viral extraído, se amplificó un fragmento de 1,623 pb que cubre la totalidad del gen de la proteína de envoltura 1 y otro de 1,559 pb que cubre el de la proteína de envoltura 2. La amplificación se realizó con el kit BluePrint RT-PCR de TaKaRa (Shiga, Japón). Se sintetizó ADN complementario con el iniciador diseñado para la región 3' del gen E1. Posteriormente se utilizó el ADNc para amplificar los fragmentos. La secuencia de los iniciadores y la mezcla de reactivos se muestran en las tablas 12, 13 y 14.

Tabla 12. Secuencia de iniciadores utilizados para la amplificación del gen E1 y E2

Iniciador	Secuencia 5' – 3'	Tamaño amplificado (pb)
E1_5_F	ACACCGTACGAACTGACACC	-
E1_3_R2	TCTTTAGGGACGCGTATGCC	1623
E2_5_F	CACACCCTGCTGCTACGAAA	-
E2_5_R	CGACGCTCAGTACGGCTAAA	1559

Tabla 13. Condiciones de reacción para síntesis de ADNc

Reactivo	Volumen (μ L)
dNTP 10 mM	1
E1_3_R 2 pmol/ μ L	1
ARN	8
Total	10

Las reacciones fueron incubadas a 65°C por 5 min y se enfriaron en hielo por 3 min. Posteriormente se agregaron los siguientes componentes de la tabla 14 a la reacción previa. Después de tener completos los componentes de la reacción se procedió a seguir el siguiente programa de temperatura que se muestra en la tabla 15. Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador Veriti (Applied Biosystems).

Tabla 14. Condiciones de reacción para síntesis de ADNc II

Reactivo	Volumen (µL)
Reacción anterior	10
Amortiguador 5X BluePrint RT	4
Inhibidor de RNasas	0.5
Agua libre de nucleasas	5
Enzima BluePrint RTase	0.5
Total	20

Tabla 15. Programa de temperatura para la síntesis de ADNc

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	30	10
2	42	30
3	95	5
4	4	-

5.14 Protocolo para amplificación por PCR

Una vez sintetizado el ADNc se procedió a realizar la PCR de amplificación de los genes E1 y E2. Los componentes de la reacción de PCR se enlistan a continuación (tabla 16), así como el programa de temperaturas (tabla 17).

Tabla 16. Condiciones de reacción para la amplificación de los genes E1 y E2

Reactivo	Volumen (μL)
Amortiguador 10 X PCR II	2.5
dNTP 10 nM	1
Iniciador 5_F 10 μM	0.25
Iniciador 3_R 10 μM	0.25
Agua libre de nucleasas	18.75
Enzima EX Taq HS	0.25
ADNc	2
Total	25

Tabla 17. Programa de temperatura para la amplificación genes E1 y E2

Paso	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo
1	94	3 min
2	94	30 s
3	61	45 s
4	72	2 min
5	40 ciclos desde 2	
6	72	10 min
7	4	-

5.15 Electroforesis de los fragmentos amplificados de los genes E1 y E2

Para la visualización de los productos amplificados se realizó electroforesis en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1X. El gel fue teñido con SYBR Safe gel DNA Stain (Invitrogen). Se utilizó el marcador QuickLoad 1Kb ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) y se colocaron los 50 μL de reacción de PCR. El gel se corrió en amortiguador TBE 1X a 100 V hasta que el colorante de carga llegó al final del gel. El gel fue examinado bajo luz UV. Una banda grande y brillante fue la requerida para la extracción del gel y secuenciación.

5.16 Purificación del producto amplificado

Para extraer del gel el producto amplificado por PCR, se utilizó el QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN). Primero se cortó el fragmento de ADN del gel de agarosa con un bisturí limpio y afilado, removiendo la mayor cantidad de agarosa posible. El fragmento de gel se colocó en un tubo de 1.5 mL y se agregaron tres volúmenes del amortiguador QC. El tubo fue calentado a 50°C por 10 min. Posteriormente se agregó un volumen de isopropanol, se mezcló y se colocaron 800 µL de la mezcla en la columna QIAquick. Se centrifugó a 14,000 rpm por 1 min, el filtrado fue descartado y se colocó la mezcla restante en la columna para volver a centrifugar. Se descartó el filtrado y se añadieron 500 µL de amortiguador QG para después centrifugar por 1 min y descartar el filtrado. La columna fue lavada por 750 µL de amortiguador PE y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Posterior a la incubación se centrifugó por 1 min. Se descartó el filtrado y se volvió a centrifugar por 1 min. La columna fue colocada en un tubo nuevo y para la elución del ADN, se añadieron 40 µL de amortiguador de elución en el centro de la membrana de la columna. La columna fue incubada por 2 min y se centrifugó por 1 min.

5.17 Cuantificación de ADN extraído

Posterior a la elución, los ácidos nucleicos fueron cuantificados en NanoDrop 2000 utilizando la solución de elución como blanco.

5.18 Reacción de secuenciación de los genes E1 y E2 de CHIKV

La reacción de secuenciación se realizó utilizando el BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Se utilizaron seis iniciadores para cada una de las muestras y genes. Se utilizó un iniciador diferente por cada reacción. Los iniciadores utilizados y los componentes de la reacción se muestran en las tablas 18 y 19. Los tubos donde se realizó la mezcla se mantuvieron en un bloque frío. Las reacciones fueron sometidas a los ciclos de temperaturas expuestos en la tabla 20.

Tabla 18. Iniciadores secuenciación genes E1 y E2

Iniciador	Secuencia 5' – 3'
E1_5_F	ACACCGTACGAACTGACACC
E1_5_R	TGAGCCCTGTATGCTGATGC
E1_C_F	AGCGAAGCACATGTGGAGAA
E1_C_R	CGTCCGGTATGTCGATGGAG
E1_3_F	ACCCGGTAAGAGCGATGAAC
E1_3_R2	TCTTTAGGGACGCGTATGCC
E2_5_F	CACACCCTGCTGCTACGAAA
E2_5_R	TCATGGTGAAATGGGTGCGT
E2_C_F	GGAGAAACTCTGACGGTGGG
E2_C_R	CGGCACGGTTAACCTGATCT
E2_3_F	TCAAGAAGAGTGGGTGACGC
E2_3_R	CGACGCTCAGTACGGCTAAA

Tabla 19. Componentes de la reacción de secuenciación

Reactivo	Volumen (µL)
Mezcla de terminadores	4
Iniciador 3.3 µM	1
Agua libre de nucleasas	variable
Amplificado	60 – 80 ng
Total	10

Tabla 20. Programa de temperaturas utilizado en la reacción de secuenciación

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	96	1 min
2	96	10 s
3	50	5 s
4	60	4 min
5	25 ciclos desde 2	
6	4	-

Las reacciones fueron colocadas en una placa de 96 pozos. Las reacciones fueron purificadas con Etanol/EDTA y se resuspendieron con formamida (de acuerdo a la recomendación del fabricante). Posteriormente se realizó la electroforesis capilar en el secuenciador Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems). Las secuencias fueron ensambladas con el programa SeqScape v3 utilizando el genoma de CHIKV referencia: NC_004162.2.

5.19 Reconstrucción filogenética del virus Chikungunya por máxima similitud

Las secuencias que fueron obtenidas, más las secuencias reportadas en GenBank, fueron utilizadas para hacer un alineamiento múltiple en el programa MEGA v6 (Arizona State University, Tempe, AZ, EUA) [59]. Para el alineamiento se utilizó el algoritmo MUSCLE por su rapidez y precisión. Se incluyeron secuencias de los cuatro linajes reportados de CHIKV. Se utilizó un total de 74 secuencias del gen de la proteína de envoltura 1 provenientes de 32 países, aislados durante 1953 – 2016. Para el alineamiento del gen de la proteína de envoltura 2 se utilizó el rango de secuencia correspondiente a E2 de las secuencias utilizadas para el alineamiento del gen E1. El modelo de sustitución utilizado para las secuencias de E1 fue Kimura-2 [60] con una distribución gama de cuatro categorías. El modelo utilizado para E2 fue Tamura-Nei [61], también con distribución gama de cuatro categorías. Para corroborar la filogenia se utilizaron 1,000 réplicas. Las secuencias utilizadas se enlistan en la tabla 21.

Tabla 21. Secuencias utilizadas para el análisis filogenético

Nombre	Número de acceso	Nombre de cepa	Año	Estado/País aislamiento	Linaje
CH0008 2014	KT327163.2	CH0008	2014	Chiapas/México	Asiático
CH0045 2014	KT327164.1	CH0045	2014	Chiapas/México	Asiático
CH0072 2014	KT327165.2	CH0072	2014	Chiapas/México	Asiático
LI0031 2014	KT327166.2	LI0031	2014	Chiapas/México	Asiático

TA0006	KT327167.2	TA0006	2014	Chiapas/México	Asiático
Filipinas 2013	AB860301.3	CHIKV-13-112A	2013	Filipinas	Asiático
Tanzania 1953	AF369024.2	S-27 African prototype	1953	Tanzania	ECSA I
Senegal 1983	AY726732.1	37997	1983	Senegal	Oeste de África
La Réunion 2006	DQ443544.2	LR2006_OPY1	2006	Reunión	IOL
India 1963	EF027140.1	IND-63-WB1	1963	India	Asiático
Italia 2007	EU244823.2	ITA07-RA1	2007	Italia	IOL
Malasia 2006	EU703759.1	MY002IMR/06/BP	2006	Malasia	Asiático
Singapur 2008	FJ445510.2	SGEHICH277108	2008	Singapur	IOL
Malasia 2009	FJ807895.1	0901aTw	2009	Malasia	IOL
Indonesia 2007	FJ807897.1	0706aTw	2007	Indonesia	Asiático
Malasia 2008	FN295483.3	MY/06/37348	2008	Malasia	Asiático
Francia 2010	FR846307.1	Pt11352	2010	Francia	Asiático
China 2008	GU199351.1	SD08Pan	2008	China	IOL
Tailandia 2009	GU301781.1	CHU-Chik683	2009	Tailandia	IOL
Nueva Caledonia 2011	HE806461.1	NC/2011-568	2011	Nueva Caledonia	Asiático
C.A.R 1984	HM045784.1	DakAR B 16878	1984	República de África Central	ECSA II
India 1973	HM045788.1	PO731460	1973	India	Asiático
Tailandia 1988	HM045789.1	6441-88	1988	Tailandia	Asiático
Indonesia 1983	HM045791.1	JKT23574	1983	Indonesia	Asiático
Sudáfrica 1956	HM045792.1	Vereeniging	1956	Sudáfrica	ECSA I
Tailandia 1995	HM045796.1	CO392-95	1995	Tailandia	Asiático

Filipinas 1985	HM045800.1	Hu/85/NR001	1985	Filipinas	Asiático
Sri Lanka 2007	HM045801.1	SL-CK1	2007	Sri Lanka	IOL
India 1963	HM045803.1	I-634029	1963	India	Asiático
Sudáfrica 1976	HM045805.1	AR 18211	1976	Sudáfrica	ECSA I
Nigeria 1965	HM045807.1	IbAn4824	1965	Nigeria	Oeste de África
Tailandia 1978	HM045808.1	3412-78	1978	Tailandia	Asiático
Congo 1960	HM045809.1	LSFS	1960	Congo	ECSA I
Tailandia 1958	HM045810.1	TH35	1958	Tailandia	Asiático
Uganda 1982	HM045812.1	UgAg4155	1982	Uganda	ECSA II
Costa de Marfil 1993	HM045820.1	ArA 30548	1993	Costa de Marfil	Oeste de África
C.A.R. 1978	HM045822.1	HB78	1978	República de África Central	ECSA II
Angola 1962	HM045823.1	Angola M2022	1962	Angola	ECSA II
India 2010	HM159387.1	TN06210	2010	India	IOL
Kenia 2004	HQ456255.1	Lamu33	2004	Kenia	IOL
India 2006	JF274082.1	IND-06-Guj	2016	India	IOL
Filipinas 2013	KU561461.1	1308aTw	2013	Filipinas	Asiático
Indonesia 2010	KC862329.1	NL10/152	2010	Indonesia	IOL
China 2012	KF318729.1	chik-sy	2012	China	Asiático
Filipinas 2012	KC488650.1	JC2012	2012	Filipinas	Asiático
Micronesia 2013	KJ689453.1	Yap 13-2148	2013	Micronesia	Asiático
Indonesia 2013	KM673291.1	DH130003	2013	Indonesia	Asiático
San Martin 2013	KX262991.1	SXM/H-20235- STMARTIN- 2013/2003	2013	San Martin	Asiático

Islas Vírgenes 2014	KJ451624.1	99659	2014	Islas Vírgenes	Asiático
Brasil 2014	KP164567.1	AMA2798/H804298	2014	Brasil	Asiático
Brasil 2015	KU355832.1	RJ/CHIKV/2015	2015	Brasil	Asiático
El Salvador 2014	KR559475.1	WHCHK6	2014	El Salvador	Asiático
Guatemala 2014	KR559481.1	WHCHK12	2014	Guatemala	Asiático
Honduras 2014	KR559487.1	WHCHK18	2014	Honduras	Asiático
Puerto Rico 2014	KR559495.1	WHCHK26	2014	Puerto Rico	Asiático
Nicaragua 2014	KT192739.1	7050	2014	Nicaragua	Asiático
Colombia 2015	KT211023.1	440191	2015	Colombia	Asiático
Colombia 2016	KX496989.1	COL/UF-1/2016	2016	Colombia	Asiático
Yucatán 2015	KU295130.1	YUC-A7	2015	Yucatán/México	Asiático
Yucatán 2015	KU295121.1	YUC-A36	2015	Yucatán/México	Asiático
Yucatán 2015	KU295118.1	YUC-M16	2015	Yucatán/México	Asiático
Yucatán 2015	KU295128.1	YUC-A15	2015	Yucatán/México	Asiático
Yucatán 2015	KU295127.1	YUC-A30	2015	Yucatán/México	Asiático

5.20 Reconstrucción filogenética del virus Chikungunya por máxima credibilidad de clado

Se utilizaron los mismos alineamientos realizados para la reconstrucción por máxima similitud. Sin embargo, cambiaron los modelos de sustitución. Se utilizó el modelo Hasegawa-Kishino-Yano [62] con distribución gama de cuatro categorías. Se utilizó además un reloj estricto, la coalescencia de tamaño constante y una cadena de 10,000,000 repeticiones. El archivo XML se creó en el programa BEAUti v1.8.4. El análisis se llevó a cabo en el programa BEAST v1.8.4 (University of Edinburgh, Edinburgh, Reino Unido) [63]. El tamaño de muestra efectivo (ESS) fue evaluado en

Tracer v1.6 y solo se utilizaron las reconstrucciones que tuvieron un ESS mayor a 200. Se hizo un consenso de los árboles predichos con TreeAnnotator 1.8.4 descartando el 10% de los árboles. Finalmente, el consenso de árboles se visualizó en FigTree v1.4.3.

5.21 Predicción de plegamiento proteico

Las secuencias obtenidas de E1 y E2 fueron traducidas en MEGA v6 para determinar si había mutaciones no sinónimas. Las secuencias con mutaciones no sinónimas fueron introducidas a la plataforma en línea SwissModel [64] (swissmodel.expasy.org) para su modelaje basado en homología proteica. Se utilizó como modelo la proteína cristalizada de CHIKV[65] con número de acceso: 2XFC para las dos proteínas. Se descargaron los archivos modelados y se visualizaron en PyMOL v2.1 (Schrödinger, Nueva York, NY, EUA).

5.22 Asociación variantes genéticas de CHIKV con manifestaciones clínicas

Se realizaron agrupaciones de pacientes dependiendo de la cepa con la que estaba infectado. Se compararon las manifestaciones de los pacientes dependiendo de la cepa infectante y se realizaron tablas de contingencia.

5.23 Análisis estadístico

Se realizó estadística descriptiva de la edad y género de los pacientes. El resultado para el análisis fue infección por CHIKV confirmada por RT-qPCR o ELISA. Se realizaron asociaciones bivariadas con la prueba exacta de Fisher o pruebas de chi-cuadrado. Las variables continuas con distribución normal fueron evaluadas con la prueba t para muestras independientes con varianzas iguales. Las variables continuas con distribución no normal fueron evaluadas con la prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes. Cuando se realizaron comparaciones múltiples, las variables con distribución normal fueron evaluadas con ANOVA de una vía; y las variables con

distribución no normal fueron evaluadas con la prueba de Kruskal Wallis de muestras independientes.

Todas las variables con un valor de p menor o igual a 0.25 fueron considerados para el análisis multivariado. Se realizó un modelo por regresión logística binaria, por pasos hacia atrás utilizando la razón de verosimilitud (entrada:5%, salida:10%). Se ajustó la razón de momios para edad y género. Los valores de p menores a 0.05 fueron considerados como significativos. Los datos fueron ingresados y analizados en IBM SPSS Statistics v20 (IBM Corporation, Armonk, NY, EUA).

Se calcularon los valores predictivos positivos, valores predictivos negativos, sensibilidad, especificidad y los índices de probabilidad de las diferentes combinaciones de manifestaciones clínicas que pudieran utilizarse para distinguir CHIKF de otras enfermedades febriles agudas indiferenciadas (EFAI).

5.24 Aspectos éticos

Este estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León con el siguiente número de registro: BI15-006. Todos los participantes leyeron y firmaron el consentimiento informado antes del reclutamiento. A todas las muestras se les asignó un número de identificación específico para mantener el anonimato de los pacientes.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS

6.1 Características demográficas y epidemiológicas de la población estudiada

El número de pacientes que cumplió los criterios de inclusión y aceptó entrar al estudio fue de 61. El 67% de los pacientes eran mujeres y la mediana de edad fue de 43 años, con un rango de 18 a 69 años. El 11% de los pacientes reportó haber tenido fiebre por Dengue confirmada por laboratorio y el 39% de los pacientes reportó que había personas febriles en su vivienda. La mayoría de los pacientes eran de Tapachula (77%) y solamente el 15% tenía historia de viajes recientes fuera de Chiapas. La ocupación más frecuente de los pacientes fue: empleado federal (31%), seguido de profesores (20%), hogar (16%) y enfermería (8%).

De los 61 pacientes incluidos, 52 (85%) fueron positivos para CHIKV por RT-qPCR o ELISA. De estos casos positivos, en 33 pacientes (64%) se detectó ARN viral por medio de RT-qPCR y en 19 (36%) se detectaron anticuerpos IgM anti-CHIKV por ELISA.

Tomando en cuenta la fecha del inicio de los síntomas con el establecimiento del diagnóstico, los pacientes confirmados por RT-qPCR se presentaron en una mediana de 3 días (rango de 1 a 4 días) y los pacientes confirmados por ELISA se presentaron en una mediana de 5 días (rango de 2 a 9 días).

Los nueve pacientes negativos a infección por CHIKV ya sea por RT-qPCR o ELISA resultaron ser negativos también a las PCR para detectar virus del Dengue y virus Zika. Además, los pacientes resultaron negativos en la serología para IgM contra virus del Dengue. A estos nueve pacientes se les clasificó como enfermedad febril aguda indiferenciada (EFAI).

Los pacientes positivos a la infección por CHIKV (CHIKV+) estuvieron distribuidos a través de ocho municipios del estado de Chiapas. Treinta y nueve pacientes (75%) residían en la ciudad de Tapachula; cuatro (7.7%) en Huixtla; dos (3.8%) en Huehuetán, Mazatán y Tuxtla Chico; y uno (1.9%) en Cacahoatán, Ciudad Hidalgo y Metapa.

6.2 Comparación entre pacientes con fiebre Chikungunya y Enfermedad Febril Aguda Indiferenciada

Encontramos que no existe diferencia entre el tiempo de inicio de los síntomas al comparar los pacientes con infección confirmada por CHIKV con los que padecieron de enfermedad febril aguda indiferenciada (mediana 3 días). Los pacientes con enfermedad confirmada tenían una edad mayor (mediana 45.5) a los de EFAI (mediana 37). Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (figura 14). Los pacientes positivos a infección por CHIKV fueron mayoritariamente mujeres (73%), en contraste con los pacientes con EFAI, quienes fueron mayoritariamente hombres (67%), siendo estadísticamente significativo ($p = 0.04$).

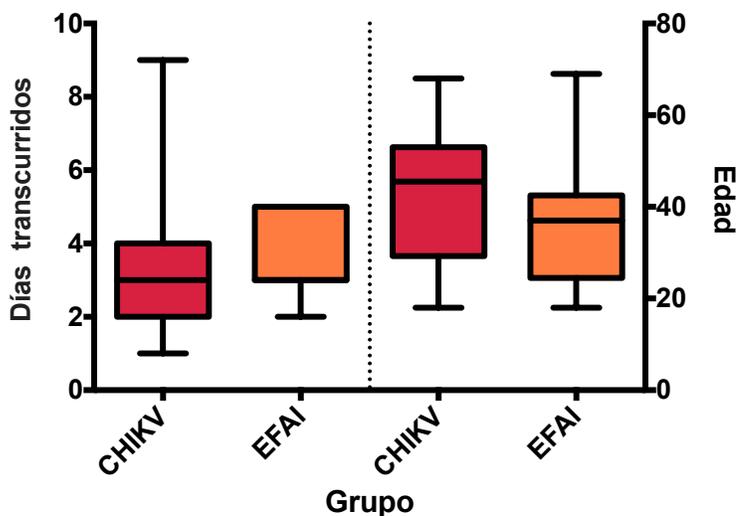


Figura 14. Días transcurridos y edad de los pacientes evaluados.

Los pacientes de ambos grupos tuvieron comorbilidades en la misma proporción (34 y 33% respectivamente). La comorbilidad más común en los pacientes CHIKV+ fue la hipertensión (83%) y en los pacientes con EFAI fue la dislipidemia (67%). No hubo diferencias en relación a la ocupación en los dos grupos estudiados. Cabe destacar que todas las enfermeras estudiadas fueron positivas para CHIKV.

De manera general, no hubo diferencias significativas en cuanto a la presentación clínica de los pacientes con infección confirmada con CHIKV y los pacientes con EFAI. Por lo contrario, los pacientes positivos para CHIKV reportaron artritis en una mayor proporción (65% vs. 11%, $p = 0.003$). Las diversas manifestaciones clínicas se presentan en la tabla 22.

Tabla 22. Manifestaciones clínicas presentadas por los pacientes evaluados

Síntoma	CHIKV+ <i>n</i> = 52	EFAI <i>n</i> = 9	Valor de <i>p</i>
Artralgia	51 (98)	8 (89)	0.275
Mialgia	51 (98)	9 (100)	1.000
Cefalea	47 (90)	8 (89)	1.000
Dolor retroorbitario	16 (31)	4 (44)	0.458
Hiperemia conjuntival	21 (40)	3 (33)	1.000
Escalofrío	44 (85)	6 (67)	0.343
Astenia	39 (75)	4 (44)	0.108
Exantema	32 (62)	5 (56)	0.729
Prurito	35 (67)	5 (56)	0.706
Artritis *	34 (65)	1 (11)	0.003*
Adenopatía	25 (48)	1 (11)	0.065
Vértigo	17 (33)	3 (33)	1.000

Síntomas gastrointestinales	50 (96)	8 (89)	0.386
Dolor abdominal	20 (39)	3 (33)	1.000
Anorexia	40 (77)	6 (67)	0.676
Disgeusia	39 (75)	4 (44)	0.108
Diarrea	15 (29)	5 (56)	0.139
Nausea	34 (65)	5 (56)	0.710
Vómito	5 (10)	2 (22)	0.273
Signos hemorrágicos	12 (23)	4 (44)	0.224
Epistaxis	3 (6)	0	1.000
Gingivorragia	5 (10)	2 (22)	0.273
Petequias	5 (10)	2 (22)	0.273

Los valores son: número (%). Prueba exacta de Fisher. * $p < 0.01$

Todos los pacientes reportaron artralgia simétrica. Los pacientes positivos para CHIKV reportaron un número mayor de articulaciones afectadas (mediana 38) comparado con los pacientes con EFAI (mediana 13) siendo estadísticamente significativo (figura 15).

En pacientes positivos para CHIKV, la artralgia afectó con mayor proporción a las articulaciones glenohumeral, muñeca, metacarpofalángicas y rodilla (figura 16). Los pacientes con infección por CHIKV confirmada fueron significativamente más propensos a tener artralgia en muñeca, metacarpofalángicas y rodilla.

Los pacientes con infección confirmada por CHIKV manifestaron artritis en mayor proporción que los pacientes con EFAI. Las diferentes articulaciones afectadas por artritis se pueden observar en la figura 17. Los pacientes presentaron desde una hasta cinco articulaciones afectadas por artritis.

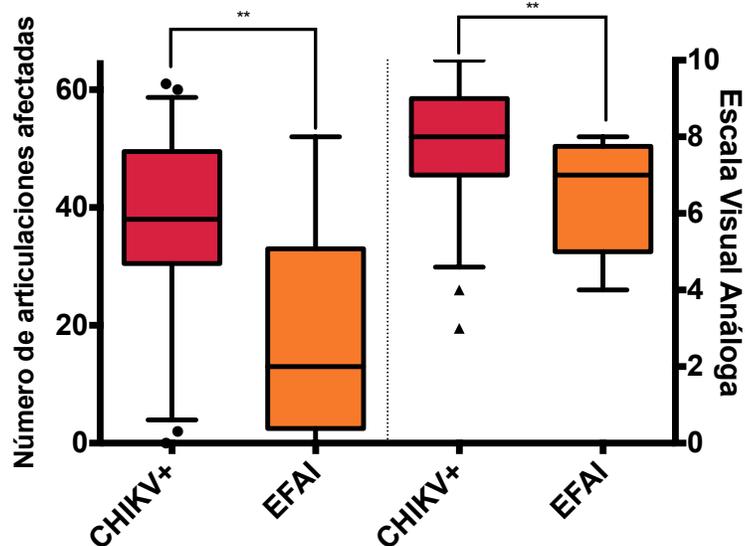


Figura 15. Número de articulaciones afectadas y cantidad de dolor presentado por los pacientes. ** Articulaciones: prueba de t para muestras independientes con varianzas iguales, $p = 0.0067$; ** Escala visual análoga: prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes, $p = 0.008$.

El exantema estuvo presente en el 62% de los pacientes positivos para CHIKV y en el 56% de los pacientes con EFAI. El exantema se presentó principalmente en las extremidades superiores, no afectando las manos. Las extremidades inferiores fueron afectadas especialmente en los pacientes positivos a CHIKV. La distribución del exantema se puede observar en la figura 18.

El cuarenta y nueve por ciento de los pacientes reportó necesitar algún tipo de ayuda para realizar sus actividades diarias ($n=45$). Interesantemente todos los pacientes que reportaron necesitar ayuda fueron positivos para CHIKV. Los pacientes necesitaron ayuda principalmente para levantarse de una posición y caminar (74% y 68% respectivamente) (figura 19).

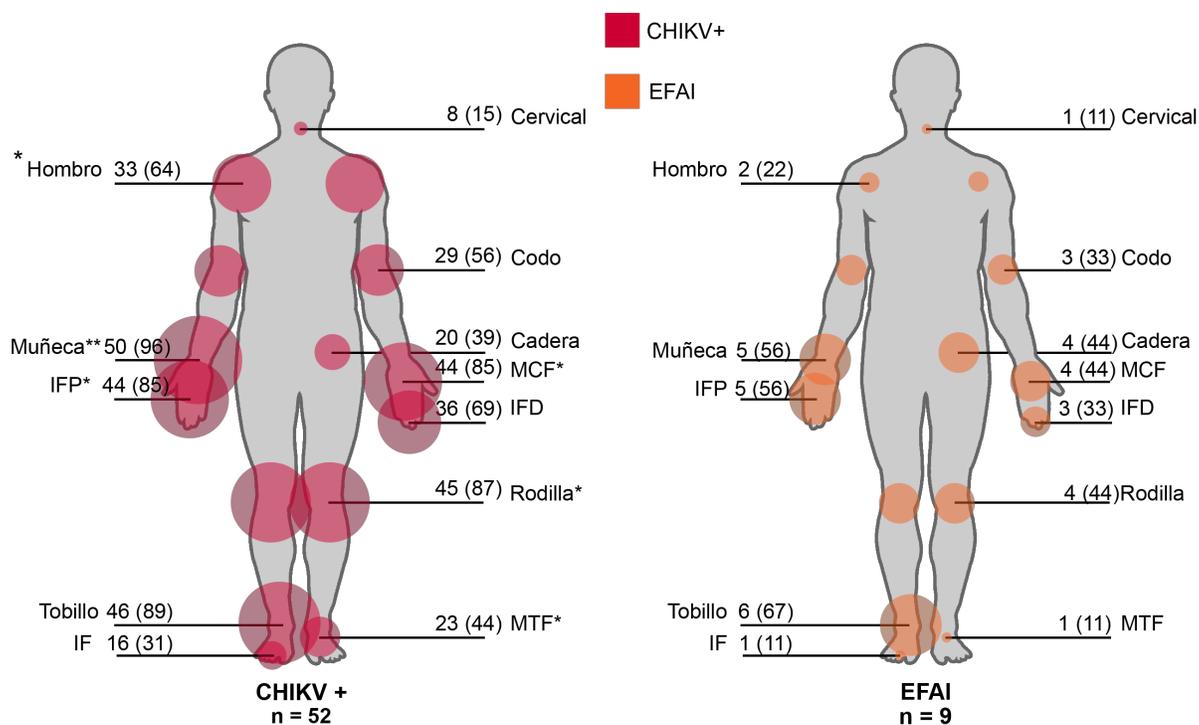


Figura 16. Distribución de la artralgia presentada por los dos grupos de pacientes evaluados. Para fines ilustrativos solo se muestran las articulaciones unilaterales. Los valores son: número (%). CHIKV+, positivo para la infección por el virus Chikungunya; EFAI, enfermedad febril aguda indiferenciada; MCP, metacarpofalángica; IFP, interfalángica proximal; IFD, interfalángica distal; MTF, metatarsofalángica; IF, interfalángica. Prueba exacta de Fisher * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Los pacientes infectados con CHIKV reportaron dolor con mayor intensidad (mediana 8) que los pacientes con EFAI (mediana 7), siendo estadísticamente significativo ($p = 0.008$) (figura 15). Las mujeres reportaron mayor dolor (mediana 9) que los hombres (mediana 7) y también fue estadísticamente significativo ($p = 0.006$).

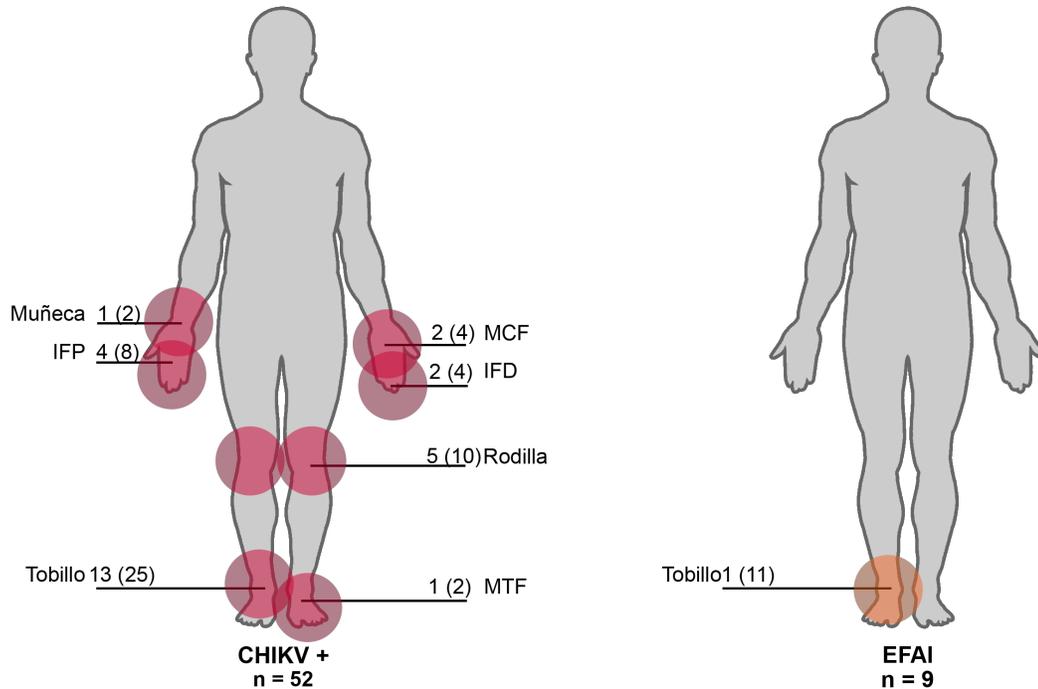


Figura 17. Distribución de artritis presentada por los pacientes evaluados. Para fines ilustrativos solo se muestran las articulaciones unilaterales. Los valores son: número (%). CHIKV+, positivo para la infección por el virus Chikungunya; EFAI, enfermedad febril aguda indiferenciada; MCP, metacarpofalángica; IFP, interfalángica proximal; IFD, interfalángica distal; MTF, metatarsfalángica. Prueba exacta de Fisher, $p > 0.05$.

El dolor no se asoció con el incremento en la edad (figura 20). Los pacientes con artritis reportaron mayor dolor que los pacientes sin artritis ($p = 0.04$). Entre más articulaciones tenían afectadas los pacientes mayor era el dolor (figura 21). Además, los pacientes que necesitaron ayuda reportaron mayor dolor (mediana 9) que los pacientes que no la necesitaron (mediana 7) ($p = 0.01$).

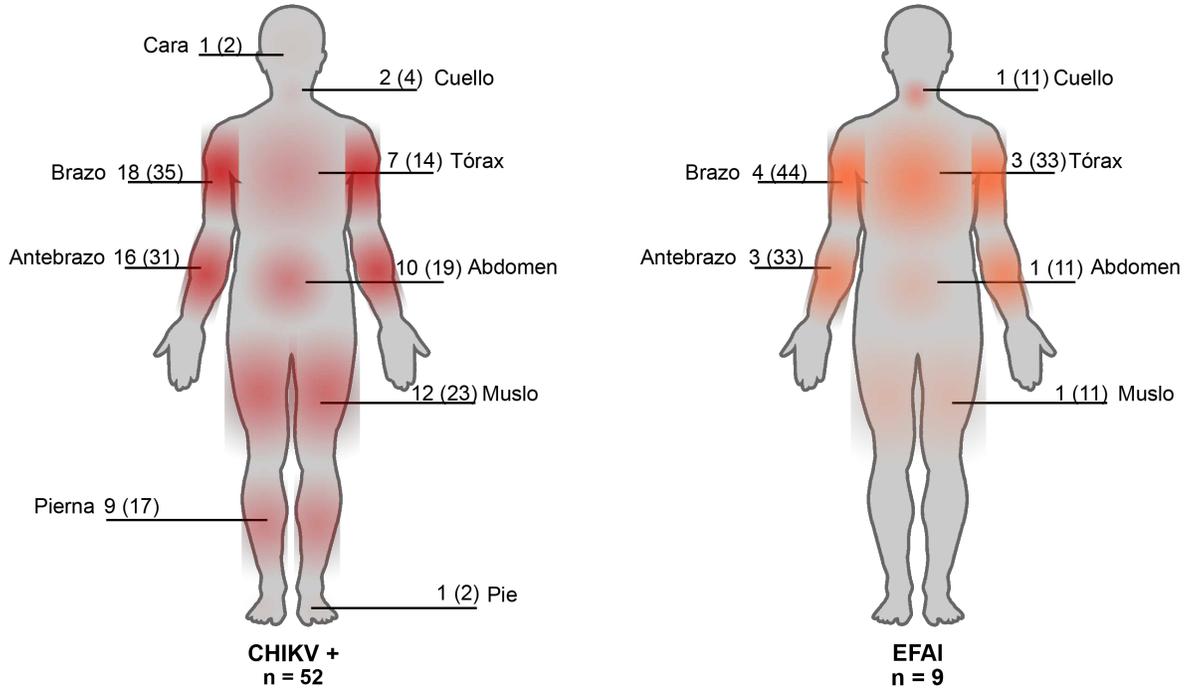


Figura 18. Distribución del exantema en los pacientes estudiados. Los valores son: número (%). CHIKV+, positivo para la infección por el virus Chikungunya; EFAI, enfermedad febril aguda indiferenciada. Prueba exacta de Fisher, $p > 0.05$.

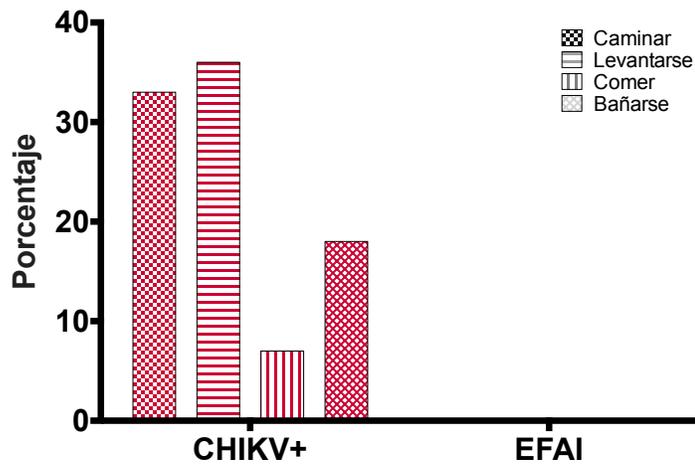


Figura 19. Ayuda requerida reportada por los pacientes evaluados. El tamaño de la muestra fue de 45 pacientes. Prueba exacta de Fisher, $p > 0.05$.

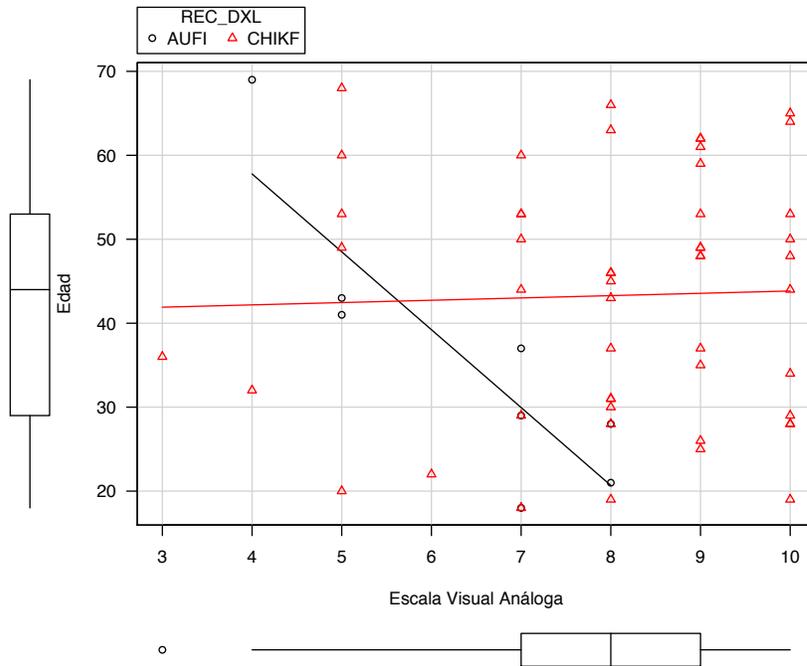


Figura 20. Distribución del dolor presentado por los pacientes en función de la edad. AUI, enfermedad febril aguda indiferenciada; CHIKF, fiebre Chikungunya

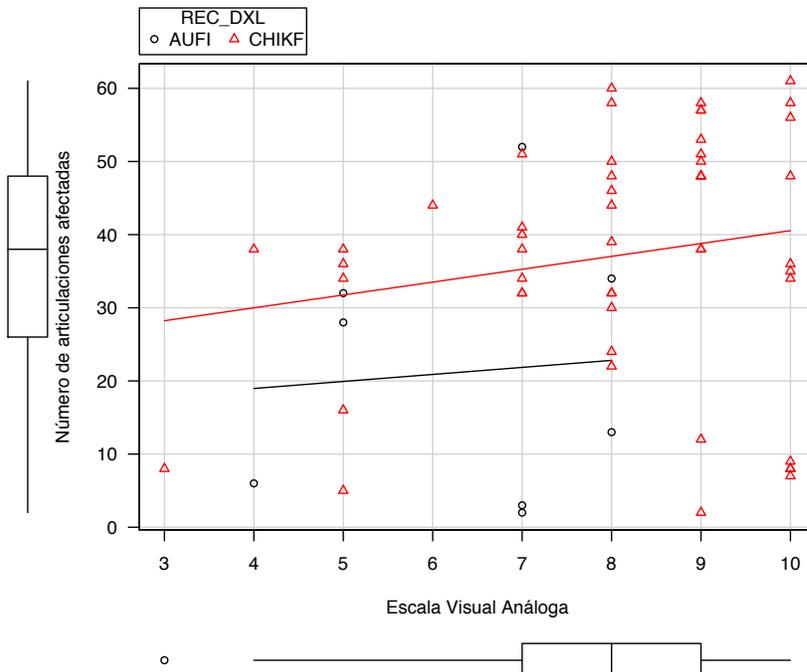


Figura 21. Distribución del dolor presentado por los pacientes en función del número de articulaciones afectadas por artralgia. AUI, enfermedad febril aguda indiferenciada; CHIKF, fiebre Chikungunya

Pudimos entrevistar a cuatro pacientes positivos a CHIKF después de 14 meses de inicio de los síntomas. La edad promedio de los pacientes fue 51 años y el 75% fueron mujeres. Ninguno de los pacientes se consideraba curado después de 14 meses. Tres de los pacientes reportaron un periodo libre de dolor. Al momento de la entrevista los cuatro pacientes presentaban dolor. El paciente masculino reportó mayor dolor en la segunda entrevista (EVA 4 vs. 7). La mitad de los pacientes reportó que el dolor afectaba de manera negativa su calidad de vida, y tres cuartos reportaron cambios de ánimo. La mitad de los pacientes aún requerían ayuda para realizar sus actividades diarias. La distribución de la artralgia y artritis en las dos ocasiones de entrevista se presentan en la figura 22. La artralgia en mano se resolvió en casi todos los pacientes. En contraste con la artralgia en rodilla, que continuó en todos. La mitad de los pacientes desarrolló artralgia en articulaciones previamente sin dolor. La artritis en mano se resolvió en los pacientes afectados; no obstante, dos pacientes desarrollaron artralgia en rodilla y muñeca (figura 22).

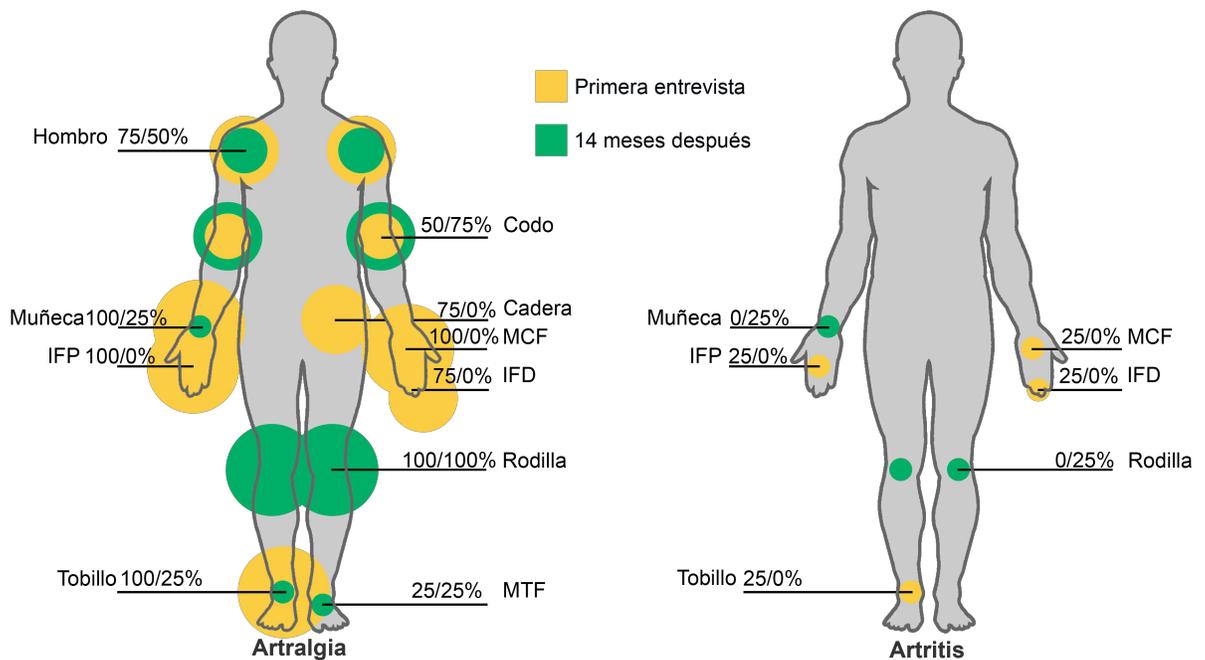


Figura 22. Distribución de artralgia y artritis en la primera entrevista y 14 meses después de cuatro pacientes con CHIKF crónica. Los valores son: número (%). MCP, metacarpofalángica; IFP, interfalángica proximal; IFD, interfalángica distal; MTF, metatarsfalángica.

Pudimos obtener 39 direcciones de los domicilios de los casos confirmados de CHIKF. Treinta fueron de Tapachula y nueve del resto de las ciudades. Los pacientes de Tapachula tenían sus casas distribuidas a través de la ciudad. En base a la distancia de vuelo de 400 m de los mosquitos hembra *A. aegypti*, se aplicó una distancia de 200 m alrededor de los domicilios de los casos confirmados. Esto dio como resultado siete grupos de infecciones en la ciudad. En cinco de los grupos estuvieron involucrados dos domicilios y en dos grupos estuvieron involucrados entre tres y cuatro domicilios (figura 23). La distancia promedio entre los domicilios de los grupos fue de 240 m.

6.3 Comparación entre pacientes con infección confirmada por RT-qPCR y anticuerpos IgM

Los pacientes con infección confirmada por RT-qPCR se presentaron en una mediana de 3 días, a comparación de los confirmados por IgM, quienes se presentaron en una mediana de 5 días. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$). La edad de los pacientes de ambos grupos (RT-qPCR e IgM) fue similar, promedio de 41 y 44 años de edad, respectivamente. El porcentaje de mujeres en el grupo confirmado por RT-qPCR y ELISA fue de 61% y 95%, respectivamente. El 93% del total de hombres fue confirmado como CHIKV por RT-qPCR. Los pacientes de ambos grupos presentaron hipertensión arterial como la comorbilidad más frecuente. La ocupación más frecuente del grupo RT-qPCR fue empleado federal (42%) y del grupo IgM fue enfermera (21%).

Los pacientes de ambos grupos presentaron casi la misma proporción de sintomatología (tabla 23). La excepción fue adenopatía, que estuvo presente en mayor proporción en el grupo de IgM; no obstante, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Se observa una tendencia en la proporción de cefalea, donde los pacientes con enfermedad aguda la presentan en mayor proporción.

Tabla 23. Manifestaciones clínicas presentadas por los pacientes evaluados (RT-qPCR vs. IgM)

Síntoma	RT-qPCR <i>n</i> = 33	IgM <i>n</i> = 19	Valor de <i>p</i>
Artralgia	33 (100)	18 (95)	0.365
Mialgia	33 (100)	18 (95)	0.365
Cefalea	32 (97)	15 (79)	0.054
Dolor retroorbitario	12 (36)	4 (21)	0.353
Hiperemia conjuntival	13 (39)	8 (42)	1.000

Escalofrío	29 (88)	15 (79)	0.443
Astenia	25 (76)	14 (74)	1.000
Exantema	18 (55)	14 (74)	0.240
Prurito	22 (67)	13 (68)	1.000
Artritis	21 (64)	13 (68)	0.771
Adenopatía	13 (39)	12 (63)	0.150
Vértigo	9 (27)	8 (42)	0.360
Síntomas gastrointestinales	32 (97)	18 (95)	1.000
Dolor abdominal	13 (39)	7 (37)	1.000
Anorexia	27 (82)	13 (68)	0.317
Disgeusia	26 (79)	13 (68)	0.510
Diarrea	7 (21)	8 (42)	0.126
Nausea	24 (73)	10 (53)	0.226
Vómito	2 (6)	3 (16)	0.342
Signos hemorrágicos	7 (21)	5 (26)	0.739
Epistaxis	1 (3)	2 (11)	0.546
Gingivorragia	4 (12)	1 (5)	0.641
Petequias	3 (9)	2 (11)	1.000

Los valores son: número (%). Prueba exacta de Fisher.

Los pacientes de ambos grupos presentaron una distribución de artralgia similar. El codo fue la articulación mayormente afectada en pacientes del grupo RT-qPCR ($p = 0.04$). Las demás articulaciones evaluadas se enlistan en la tabla 24. Podemos observar una tendencia en la articulación del hombro, donde se presenta en mayor proporción en el grupo RT-qPCR.

Tabla 24. Distribución de la artralgia en los dos grupos de pacientes con infección confirmada.

Artralgia	RT-qPCR <i>n</i> = 33	IgM <i>n</i> = 19	Valor de <i>p</i>
Cervical	4 (12)	4 (21)	0.443
Hombro	24 (73)	9 (47)	0.081
Codo*	22 (67)	7 (37)	0.047*
Muñeca	33 (100)	17 (90)	0.546
MCF	29 (88)	15 (79)	0.708
IFP	29 (88)	15 (79)	0.708
IFD	23 (70)	13 (69)	1.000
Cadera	16 (49)	4 (21)	0.734
Rodilla	30 (91)	15 (79)	0.400
Tobillo	31 (94)	15 (79)	0.175
MTF	17 (52)	6 (32)	0.247
IF	12 (36)	4 (21)	0.353

Los valores son: número (%). MCP, metacarpofalángica; IFP, interfalángica proximal; IFD, interfalángica distal; MTF, metatarsofalángica. Prueba exacta de Fisher. * $p < 0.05$

Como se expuso anteriormente, los pacientes con fiebre Chikungunya presentaron artritis en diversas articulaciones. Separando por los grupos diagnósticos se puede observar que los pacientes con infección aguda (RT-qPCR) presentan mayor proporción de artritis que los pacientes con infección subaguda (IgM) (tabla 25).

Tabla 25. Articulaciones con artritis en los dos grupos de pacientes con infección confirmada

Artritis	RT-qPCR <i>n</i> = 33	IgM <i>n</i> = 19	Valor de <i>p</i>
Muñeca	1 (3)	-	1.000
MCF	2 (6)	-	0.527
IFP	4 (12)	-	0.284
IFD	2 (6)	-	0.527
Rodilla	3 (9)	1 (5)	1.000
Tobillo	9 (27)	5 (26)	1.000
MTF	1 (3)	-	1.000

Los valores son: número (%). MCP, metacarpofalángica; IFP, interfalángica proximal; IFD, interfalángica distal; MTF, metatarsofalángica. Prueba exacta de Fisher.

El exantema afectó en mayor proporción a los pacientes del grupo IgM. La mediana de porcentaje de áreas afectadas por exantema en el grupo IgM fue de 9% y de RT-qPCR 0%. Aunque la proporción fue mayor en el grupo IgM la diferencia no fue estadísticamente significativa. La proporción de áreas afectadas por el exantema en los dos grupos se muestra en la tabla 26. Sin embargo, el número de áreas afectadas por el exantema incrementaba conforme aumentaban los días de inicio de síntomas (figura 24).

Tabla 26. Áreas afectadas por exantema en los pacientes de los grupos RT-qPCR e IgM

Área	RT-qPCR <i>n</i> = 33	IgM <i>n</i> = 19	Valor de <i>p</i>
Cara	1 (3)	-	1.000
Cuello	1 (3)	1 (5)	1.000
Tórax	3 (9)	4 (21)	0.400
Abdomen	4 (12)	6 (32)	0.142

Antebrazo	9 (27)	9 (47)	0.224
Brazo	8 (24)	8 (42)	0.220
Muslo	6 (18)	6 (32)	0.317
Pierna	3 (9)	6 (32)	0.059
Pie	-	1 (5)	0.365

Los valores son: número (%). Prueba exacta de Fisher.

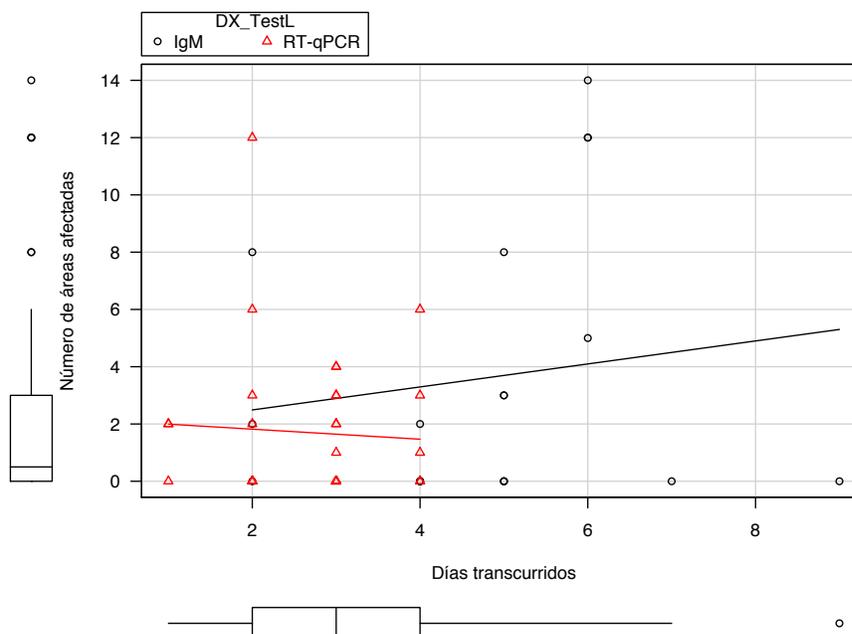


Figura 24. Áreas afectadas por exantema en función de los días transcurridos después del inicio de síntomas.

Sesenta por ciento de los pacientes del grupo RT-qPCR requirieron ayuda para realizar sus actividades diarias, comparado con el grupo IgM donde solo el 28% requirió ayuda ($p = 0.096$). Se encontró una tendencia en cuanto a la ayuda a caminar. Los pacientes con infección aguda necesitaron ayuda para caminar en el 44% de los pacientes, en comparación del grupo IgM donde el 14% necesitó ayuda ($p = 0.083$).

Los pacientes de ambos grupos tuvieron valores similares en la escala visual análoga. Las mujeres del grupo RT-qPCR reportaron mayor dolor que los hombres ($p = 0.001$). En ambos grupos, al incrementar el número de articulaciones aumenta el dolor reportado (figura 25). No hubo diferencia entre el número de articulaciones afectadas de los dos grupos estudiados.

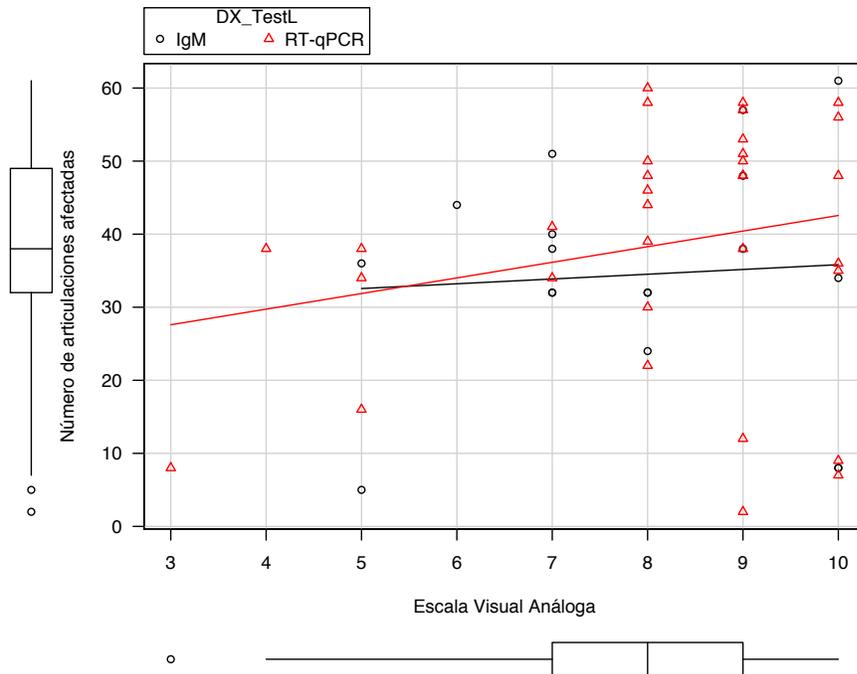


Figura 25. Número de articulaciones afectadas por artralgia en función del dolor en pacientes confirmados por RT-qPCR e IgM.

6.4 Análisis multivariado de las variables estudiadas

Después del análisis multivariado, los pacientes con infección confirmada por CHIKV fueron significativamente más probable que tuvieran artralgia en muñeca, metacarpofalángica y rodilla. De manera similar, los pacientes con infección confirmada fueron significativamente más propensos en tener un valor de EVA mayor y un mayor número de articulaciones afectadas (tabla 27).

Tabla 27. Análisis multivariado asociado a la fiebre Chikungunya

Parámetro	Razón de momios ajustada ^a	(95%Intervalo de confianza)	Valor de <i>p</i>
Artritis			
Sí	6.61	1.24–35.19	0.027
Artralgia en muñeca			
Sí	22.1	2.58–188.74	0.005
Artralgia en MCF			
Sí	6.2	1.25–30.67	0.025
Artralgia en rodilla			
Sí	5.89	1.17–29.49	0.031
EVA	1.61	1.066–2.440	0.024
Número de articulaciones afectadas	1.05	1.004–1.100	0.033

MCF, metacarpofalángica; EVA, escala visual análoga. ^a Ajustado para edad y género.

Distinguir la fiebre por CHIKV de otras enfermedades febriles agudas indiferenciadas utilizando solo las características clínicas es difícil. Sin embargo, utilizando una combinación de manifestaciones clínicas puede eficientemente diferenciar fiebre por CHIKV de otras EFAI. Encontramos dos combinaciones que pueden ser utilizadas. Una toma solo en cuenta la presencia de artralgia en muñeca, metacarpofalángicas y rodilla. La otra toma en cuenta artralgia en estas tres articulaciones más la presencia de adenopatía, artritis y más de 30 articulaciones con dolor. Ambas combinaciones tienen un valor predictivo positivo y sensibilidad arriba del 90%. La combinación de artralgia sola, tiene mejor especificidad (83%) que la más completa (75%). No obstante, la combinación más completa tiene un valor predictivo negativo más alto (66%) que la combinación de solo artralgia (55%) (tabla 28). Estas dos combinaciones pueden servir para hacer el diagnóstico de fiebre por CHIKV con base en la clínica, donde no se cuente con métodos de diagnóstico molecular o cuando haya un nuevo brote de fiebre por CHIKV. Es importante establecer un diagnóstico para

poder dar tratamiento oportuno y estratificar a los pacientes por gravedad. Además se pueden diseñar aplicaciones para iOS o Android donde se puede alimentar con los datos clínicos del paciente y obtener un pronóstico de si el paciente tiene probabilidad de tener fiebre CHIKV.

Tabla 28. Parámetros clínicos utilizados para distinguir entre fiebre por CHIKV y EFAI

Parámetros	VPP (%)	VPN (%)	Sens (%)	Esp (%)	Índice de probabilidad (+)	Índice de probabilidad (-)
Artralgia en muñeca	96.1	44.4	90	66.6	2.72	0.13
Artralgia en muñeca, MCF y rodilla	98	55	92.7	83.3	5.56	0.08
Artralgia en muñeca, MCF y rodilla más artritis (o adenopatía)	98	44.4	91	80	4.55	0.11
Artralgia en MCF y rodilla más un valor de EVA ≥ 8	96	62.5	94.2	71.4	3.29	0.08
Artralgia en muñeca, MCF y rodilla, ≥ 30 articulaciones con dolor, más artritis y adenopatía	96.1	66.6	94.3	75	3.77	0.07

VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; Sens: sensibilidad; Esp: especificidad; MCF: metacarpofalángica; EVA: escala visual análoga

6.5 Evaluación del daño hepático en la fiebre Chikungunya

Existen reportes de que CHIKV se disemina a varios tejidos incluidos en ellos el hígado. Al inicio de este estudio, no se habían evaluado las enzimas hepáticas en los pacientes mexicanos con infección confirmada por CHIKV. Se lograron evaluar pruebas de función hepática de 15 pacientes del grupo de RT-qPCR y 19 del grupo IgM. Se utilizaron como control negativo a ocho sujetos sanos.

Se encontraron ciertas alteraciones en la concentración de las enzimas. El 18% de los pacientes evaluados tuvo elevación de la fosfatasa alcalina. El 44% de los pacientes tuvo elevación de la ALT. La mitad de los pacientes presentó elevación de la AST. El 59% de los pacientes presentó elevación de la GGT. Solo el 6% tuvo elevación de la bilirrubina directa. El 3% de los pacientes tuvo una elevación de la bilirrubina total. Sin embargo, el 12% tuvo una disminución. El 9% de los pacientes mostró una elevación en la concentración de colesterol. Al contrario, el 41% de los pacientes tuvo una disminución en el colesterol. Al separar los pacientes por el grupo diagnóstico, no se observaron diferencias en las proporciones de pacientes con valores elevados (tabla 29).

Tabla 29. Distribución de valores anormales de pruebas de función hepática

Analito	RT-qPCR n = 15	IgM n =19	Valor de p
ALP ↑	2 (13)	4 (21)	0.672
ALT ↑	6 (40)	9 (47)	0.738
AST ↑	9 (60)	8 (42)	0.491
GGT ↑	7 (47)	13 (68)	0.296
BD ↑	1 (7)	1 (5)	1.000
BT ↑	1 (7)	0	0.441
BT ↓	3 (20)	1 (5)	0.299
Chol ↑	0	3 (16)	0.238
Chol ↓	7 (47)	7 (37)	0.738

Los valores son: número (%). ALP, fosfatasa alcalina; ALT, alanina aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa; GGT, γ -glutamyl transferasa; BT, bilirrubina total; BD, bilirrubina directa; Chol, colesterol; Prueba exacta de Fisher.

Al ser comparado con el grupo de referencia, la fosfatasa alcalina no mostró alteraciones francas. La mayoría de los pacientes tuvieron valores normales (figura 26 A). Después de hacer la estratificación por grupo diagnóstico, los pacientes del grupo IgM tuvieron valores ligeramente mayores. Pareciera que la ALP se eleva en etapas subagudas de la enfermedad (figura 26 B).

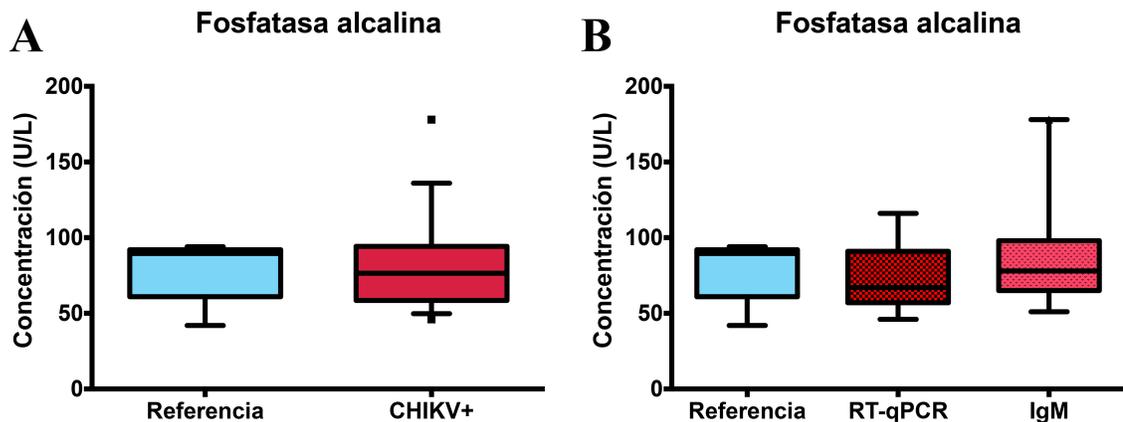


Figura 26. Concentración de fosfatasa alcalina en los sujetos estudiados. A) Referencia vs. CHIKV+: Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes $p = 0.73$. B) Referencia vs. Grupos Diagnósticos: Prueba de Kruskal Wallis de muestras independientes $p = 0.61$.

El rango de valores de ALT en los pacientes infectados fue mucho mayor que el de los sujetos de referencia. Sin embargo, el 60% de los pacientes presentó valores dentro de los límites normales (figura 27 A). Al estratificar por grupo diagnóstico, los pacientes del grupo IgM reportaron valores mayores de ALT en suero (figura 27 B).

Se observó una diferencia marcada cuando se comparó la concentración de AST de los pacientes con los sujetos sanos. El rango de los valores fue más amplio en los pacientes, siendo estadísticamente significativo (figura 28 A). Al estratificar por grupo diagnóstico se observa que los pacientes del grupo RT-qPCR tienen mayor concentración de AST en suero. Esta diferencia en la concentración fue estadísticamente significativa (figura 28 B). Esto indica daño hepático en los primeros días de la infección.

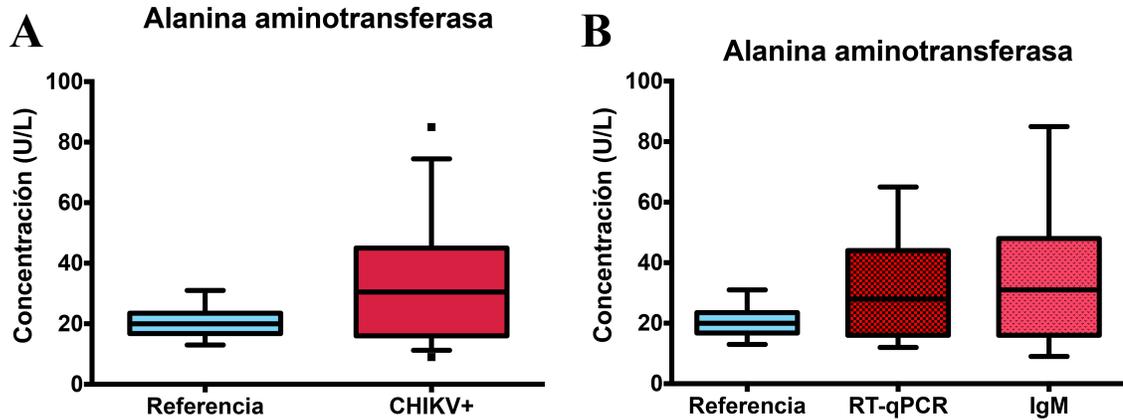


Figura 27. Concentración de alanina aminotransferasa en los sujetos estudiados. A) Referencia vs. CHIKV+: Prueba t de muestras independientes, $p = 0.100$. B) Referencia vs. Grupos Diagnósticos: ANOVA de una vía, $p = 0.24$.

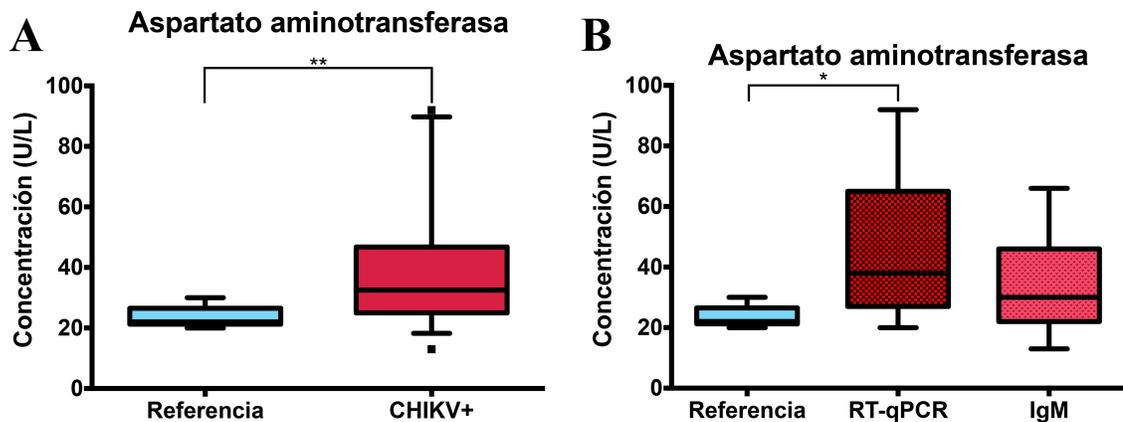


Figura 28. Concentración de aspartato aminotransferasa en los sujetos estudiados. A) Referencia vs. CHIKV+: Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes $p = 0.009$. B) Referencia vs. Grupos Diagnósticos: Prueba de Kruskal Wallis de muestras independientes $p = 0.02$.

En relación a la GGT, se observa que hay una franca elevación en los pacientes infectados. Esta diferencia en los valores de concentración fue estadísticamente significativa (figura 29 A). La distribución de los valores entre los grupos RT-qPCR e IgM fue similar (figura 29 B). Los paciente del grupo RT-qPCR tuvieron valores sutilmente mayores que los del grupo IgM, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

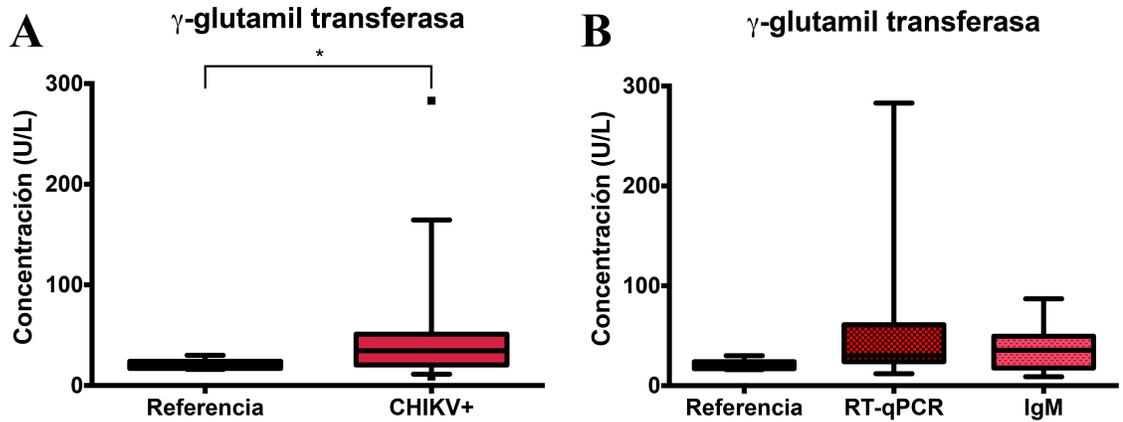


Figura 29. Concentración de γ -glutamyl transferasa en los sujetos estudiados. A) Referencia vs. CHIKV+: Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes $p = 0.03$. B) Referencia vs. Grupos Diagnósticos: Prueba de Kruskal Wallis de muestras independientes $p = 0.11$.

Interesantemente, la concentración de bilirrubina directa fue menor en los pacientes que en los sujetos sanos (figura 30 A). Esta diferencia fue estadísticamente significativa. Al estratificar por grupos diagnósticos, la diferencia continuó siendo marcada entre los sujetos sanos y el grupo RT-qPCR (figura 30 B). No hubo diferencia en la concentración de bilirrubina entre los pacientes.

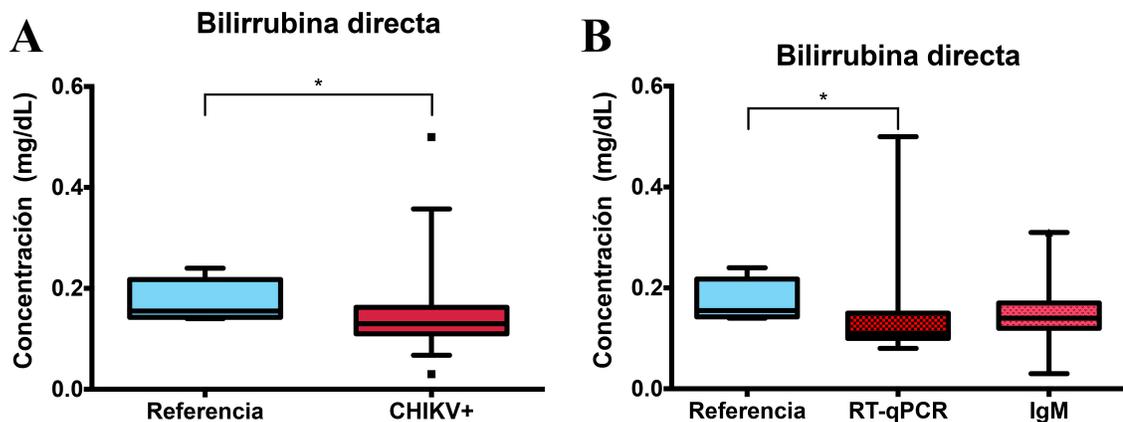


Figura 30. Concentración de bilirrubina directa en los sujetos estudiados. A) Referencia vs. CHIKV+: Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes $p = 0.02$. B) Referencia vs. Grupos Diagnósticos: Prueba de Kruskal Wallis de muestras independientes $p = 0.03$.

La bilirrubina total estuvo también disminuida en los pacientes cuando se compararon con los sujetos sanos (figura 31 A). Sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa. El rango de concentración fue menor en los pacientes del grupo RT-qPCR. La distribución de la bilirrubina total de los pacientes del grupo IgM fue muy similar a los controles sanos (figura 31 B).

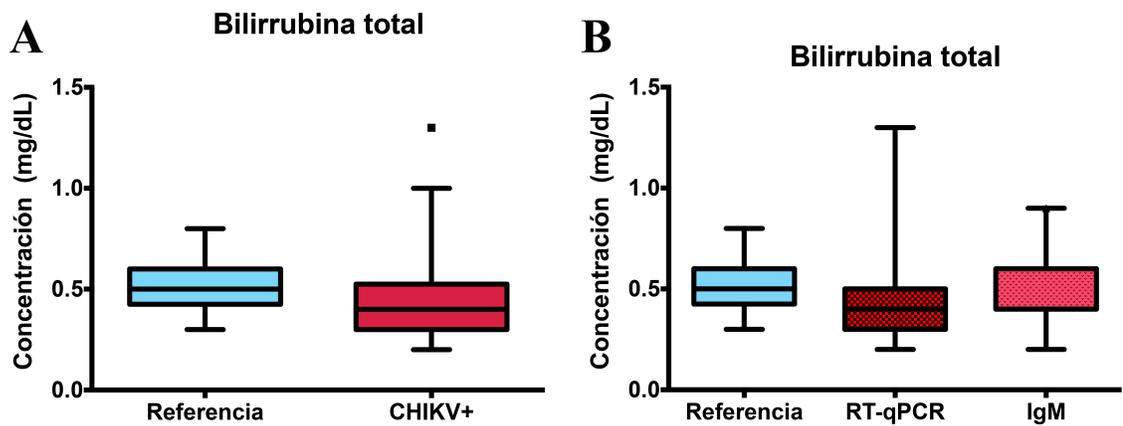


Figura 31. Concentración de bilirrubina total en los sujetos estudiados. A) Referencia vs. CHIKV+: Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes $p = 0.14$. B) Referencia vs. Grupos Diagnósticos: Prueba de Kruskal Wallis de muestras independientes $p = 0.17$.

Al igual que con la bilirrubina total, la bilirrubina indirecta estuvo disminuida en los pacientes (figura 32 A). La distribución se repitió cuando los pacientes se estratificaron por grupos (figura 32 B). Las diferencias observadas en estos analitos no fueron estadísticamente significativas.

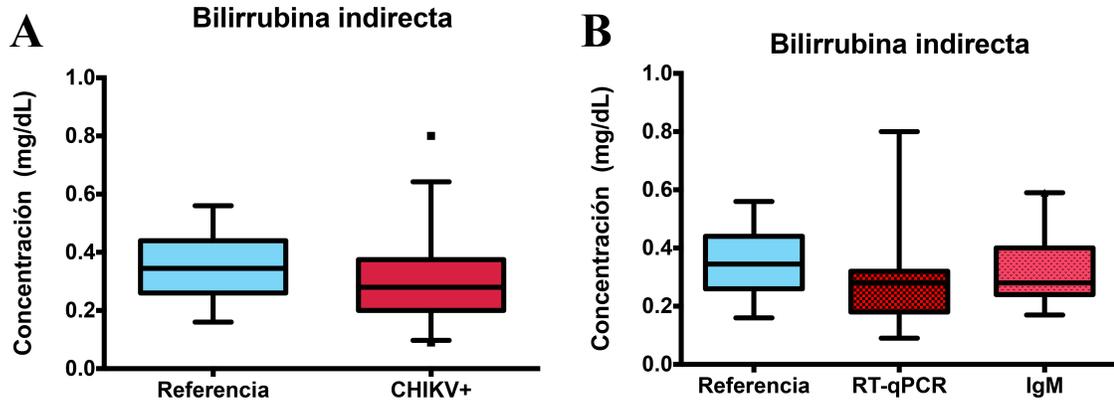


Figura 32. Concentración de bilirrubina indirecta en los sujetos estudiados. A) Referencia vs. CHIKV+: Prueba t de muestras independientes, $p = 0.100$. B) Referencia vs. Grupos Diagnósticos: ANOVA de una vía, $p = 0.24$.

Al igual que con las bilirrubinas se observó que los pacientes infectados tuvieron concentraciones menores de colesterol cuando fueron comparados con los sujetos sanos (figura 33 A). Al estratificar por grupos diagnósticos, se observa que el grupo de RT-qPCR tiene la menor concentración (figura 33 B). No obstante, estas diferencias no son estadísticamente significativas. Al parecer el colesterol disminuye en los primeros días de la enfermedad.

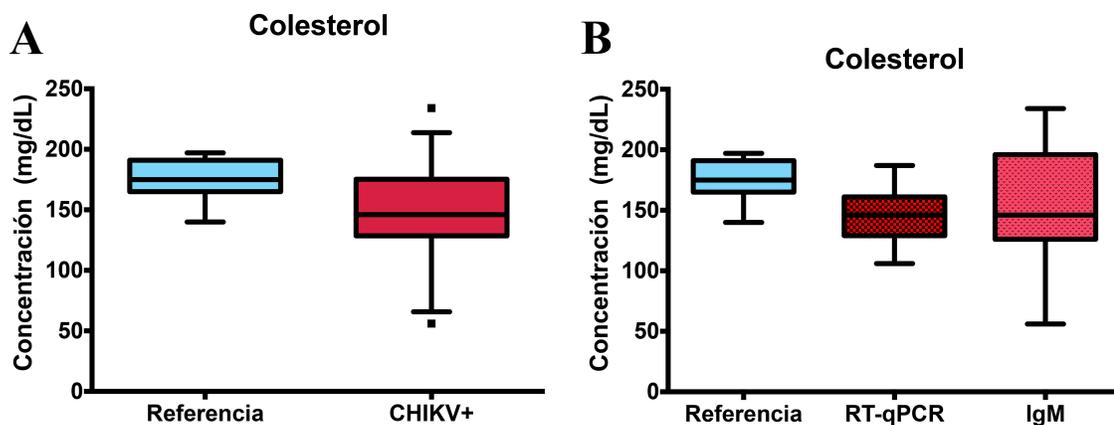


Figura 33. Concentración de colesterol en los sujetos estudiados. A) Referencia vs. CHIKV+: Prueba t de muestras independientes, $p = 0.08$. B) Referencia vs. Grupos Diagnósticos: ANOVA de una vía, $p = 0.19$.

6.6 Análisis filogenético

Se lograron obtener 20 secuencias completas del gen E1 y 10 del gen E2 de virus aislados de los pacientes. La identidad nucleotídica entre las secuencias fue del 99.6 a 100% y del 99.8 a 100% a nivel aminoacídico. Cuando las secuencias de E1 se compararon con el aislado de las Islas Vírgenes (KJ451624.1), encontramos 14 mutaciones sinónimas y 2 no sinónimas. Una de las mutaciones no sinónimas ocurrió en la posición 11 (T → C) cambiando el residuo 4 de valina a alanina. La segunda mutación no sinónima ocurrió en la posición 1025 (C → T) cambiando el residuo 342 de alanina a valina. Al comprar las secuencias de E2 con el mismo aislado de las Islas Vírgenes, se encontraron 4 mutaciones sinónimas y una no sinónima. La mutación no sinónima ocurrió en el nucleótido 338, cambiando el residuo 113 de alanina a valina. Los análisis de máxima similitud y bayesiano mostraron que las secuencias nuevas se agrupan con el resto de virus aislados en el Caribe, pertenecientes al linaje Asiático. Las secuencias anteriormente reportadas del estado de Chiapas en 2014 se agruparon con las secuencias reportadas de otros países del Caribe, Centroamérica y Sudamérica del año 2013 al 2016.

6.6.1 Secuencias del gen de la proteína de envoltura 1

Seis de las nuevas secuencias obtenidas se agruparon con las secuencias de Chiapas reportadas anteriormente. Las 14 secuencias restantes divergieron; agrupándose con ellas mismas o con otros aislados reportados del estado de Yucatán (figura 34). No obstante, estas secuencias divergentes están relacionadas con las secuencias obtenidas de los demás países de América. Las secuencias que divergieron formaron seis grupos monofiléticos con buen soporte en el análisis de máxima similitud y bayesiano. El primer grupo, donde se agruparon las secuencias obtenidas con anterioridad y las pertenecientes a otros países, se denominó clado A. Ahí se agruparon las secuencias aisladas de pacientes de Mazatán, Cacahoatán y cuatro de Tapachula. Cinco secuencias aisladas en Tapachula se agruparon con dos aislados de Yucatán, formando el clado B. El clado B fue el que contenía mayor número de secuencias después del clado A. El

clado C está compuesto por aislados de Tapachula, Guerrero y Yucatán. Este es el clado divergente donde se agrupan aislados diferentes de más de dos lugares. El clado D está formado por dos virus aislados del municipio de Tuxtla Chico. Cabe recalcar que Tuxtla Chico está pegado a Tapachula. El clado E está formado por un aislado de Tapachula y otro de Huixtla. El clado F está formado con un aislado de Tapachula y otro de Yucatán. Por último, tres secuencias divergieron pero no formaron un clado. A estas tres secuencias se les denominó clado G, aunque no fueran propiamente un clado. Las tres secuencias del clado G pertenecen a aislados de Tapachula (figura 35). Los clados formados fueron confirmados con el análisis bayesiano, donde la probabilidad posterior para cada uno de ellos fue mayor a 0.90 (figura 36). En la figura 37 se muestra un mapa del estado de Chiapas donde se localizó el domicilio de los pacientes infectados. Se puede observar que hay una gran variedad de virus circulando en los ocho municipios estudiados. Donde existe mayor variabilidad genética es en la ciudad de Tapachula. Esto puede deberse a que fue el lugar donde se muestrearon más pacientes. Al estudiar los grupos de domicilios que se hallaban en un radio menor a 200 m se encontró en dos ocasiones que en un mismo grupo de domicilios existían dos virus de diferentes clados. Además sucedió que en un mismo domicilio, el padre y el hijo estuvieron infectados con un virus de clados diferentes.

6.6.2 Secuencias del gen de la proteína de envoltura 2

Los aislados denominados ancestrales en la filogenia de E1, CA002, MA003 y TA711, se agruparon con las muestras de El Salvador, Puerto Rico, San Martín y Haití. Sin embargo, las muestras no se agruparon en el mismo clado que los aislados de Chiapas del 2014. Los aislados del 2014 formaron su propio clado junto con el aislado de las Islas Vírgenes con un soporte 62 y probabilidad posterior de 0.99 (figura 38 y 39). Las muestras TA700 y TA712 volvieron a agruparse en un clado; no obstante, el soporte y la probabilidad posterior no son concluyentes. De manera interesante, todas las secuencias incluidas de Yucatán se agruparon en un clado con buen soporte y probabilidad posterior. Las secuencias de Chiapas que se agruparon con las de Yucatán al tomar en cuenta solo E1, ya no lo hicieron al tomar en cuenta E2.

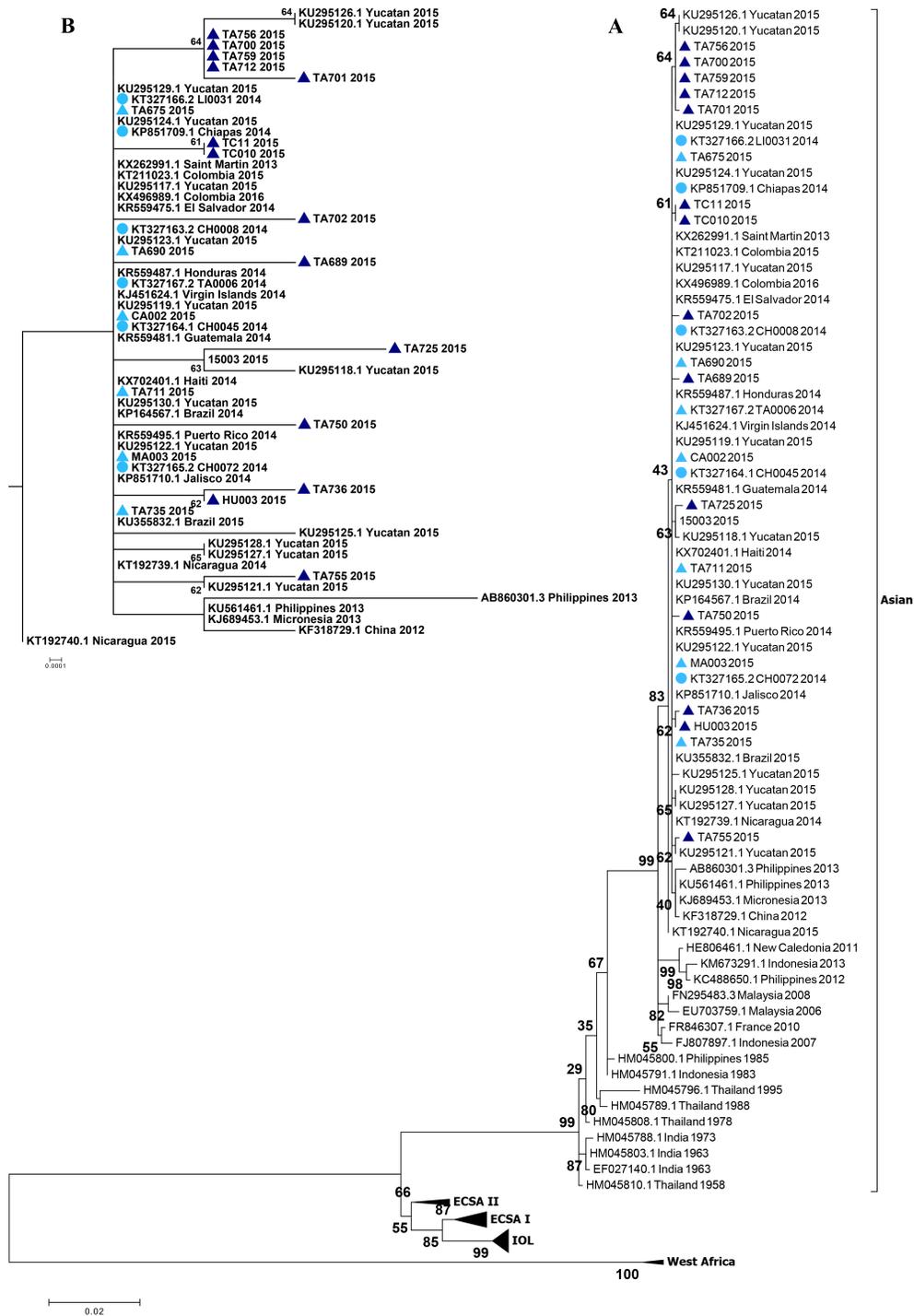


Figura 34. Reconstrucción de filogenia máxima similitud del gen E1 I. A) Árbol filogenético completo con los cuatro linajes. B) Acercamiento en las secuencias aisladas en América. Las muestras secuenciadas en este trabajo están señaladas con un triángulo. Las secuencias anteriormente secuenciadas están señaladas como círculo. Las secuencias del grupo ancestral están en azul claro, las divergentes en azul oscuro.

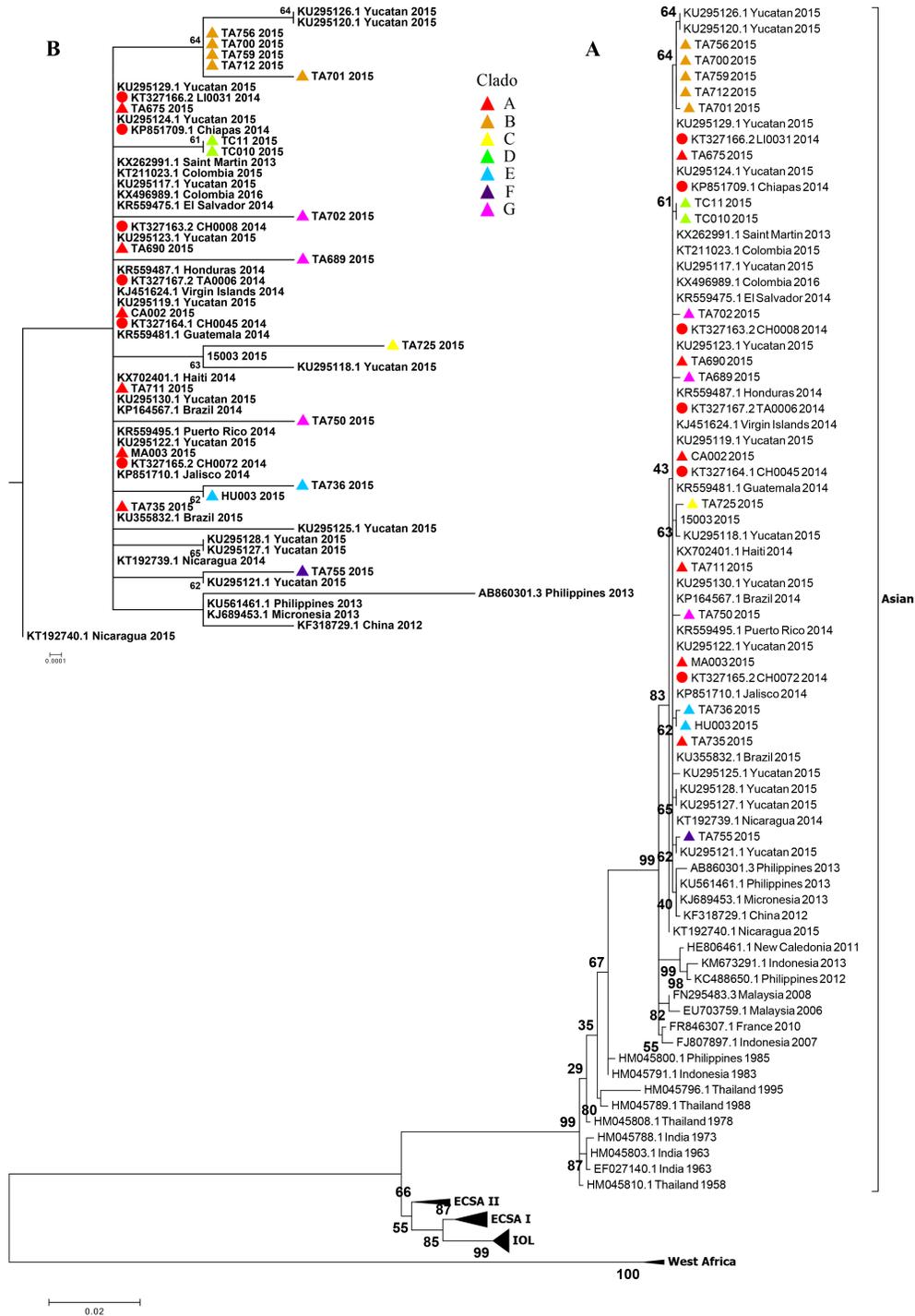


Figura 35. Reconstrucción de filogenia máxima similitud del gen E1 II A) Árbol filogenético completo con los cuatro linajes. B) Acercamiento en las secuencias aisladas en América. Se muestran los clados formados con código de colores. Los círculos indican secuencias obtenidas anteriormente y los triángulos las obtenidas en este estudio.

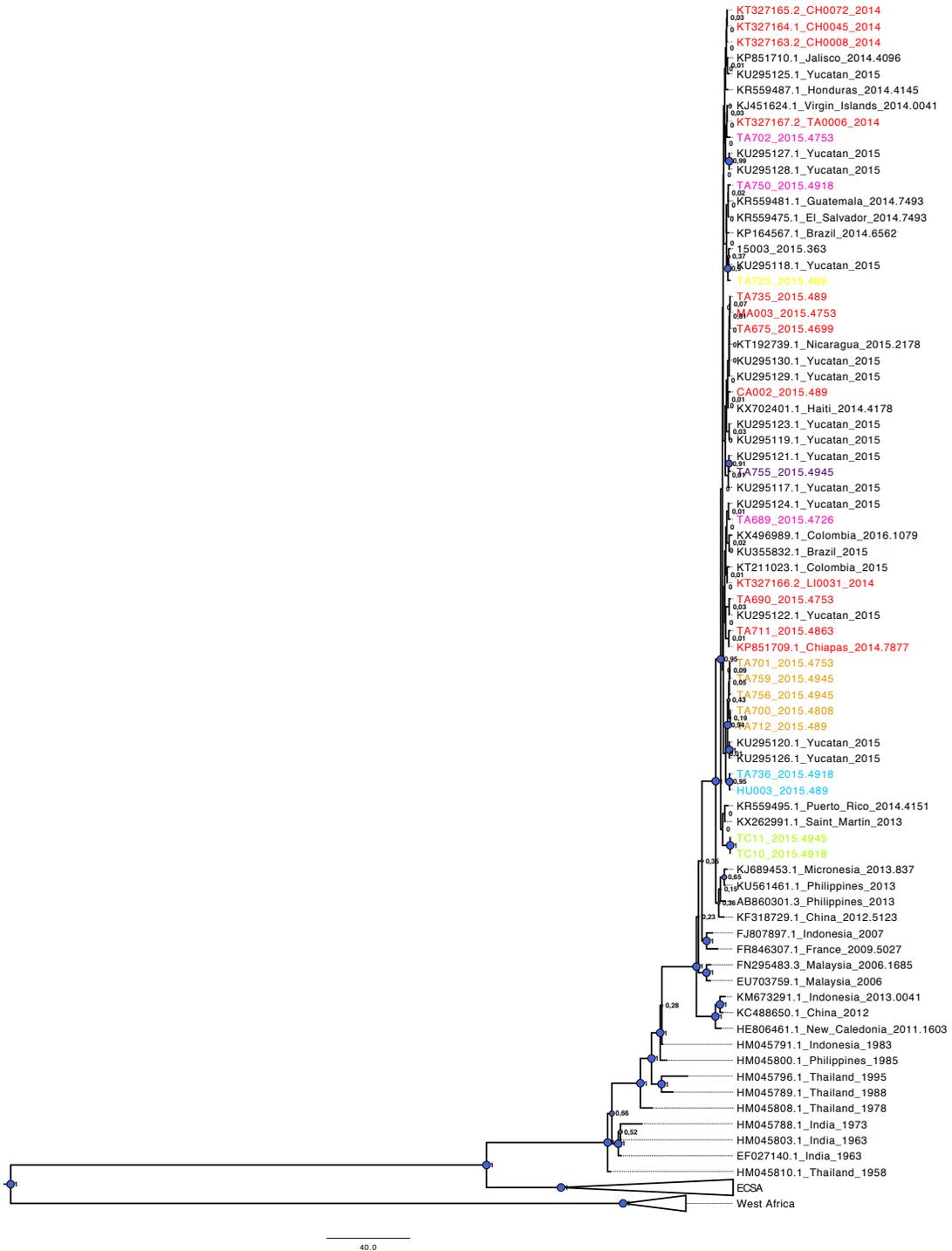


Figura 36. Reconstrucción de filogenia máxima credibilidad de clado gen E1. Se muestra el árbol completo. En los nodos se encuentra un círculo cuyo tamaño depende de la probabilidad posterior. Ésta se encuentra a lado derecho del nodo. Los diferentes clados están de acuerdo al color. Clado A, rojo; clado B, naranja; clado C, amarillo; clado D, verde; clado E, azul; clado F, morado; y clado G, magenta.

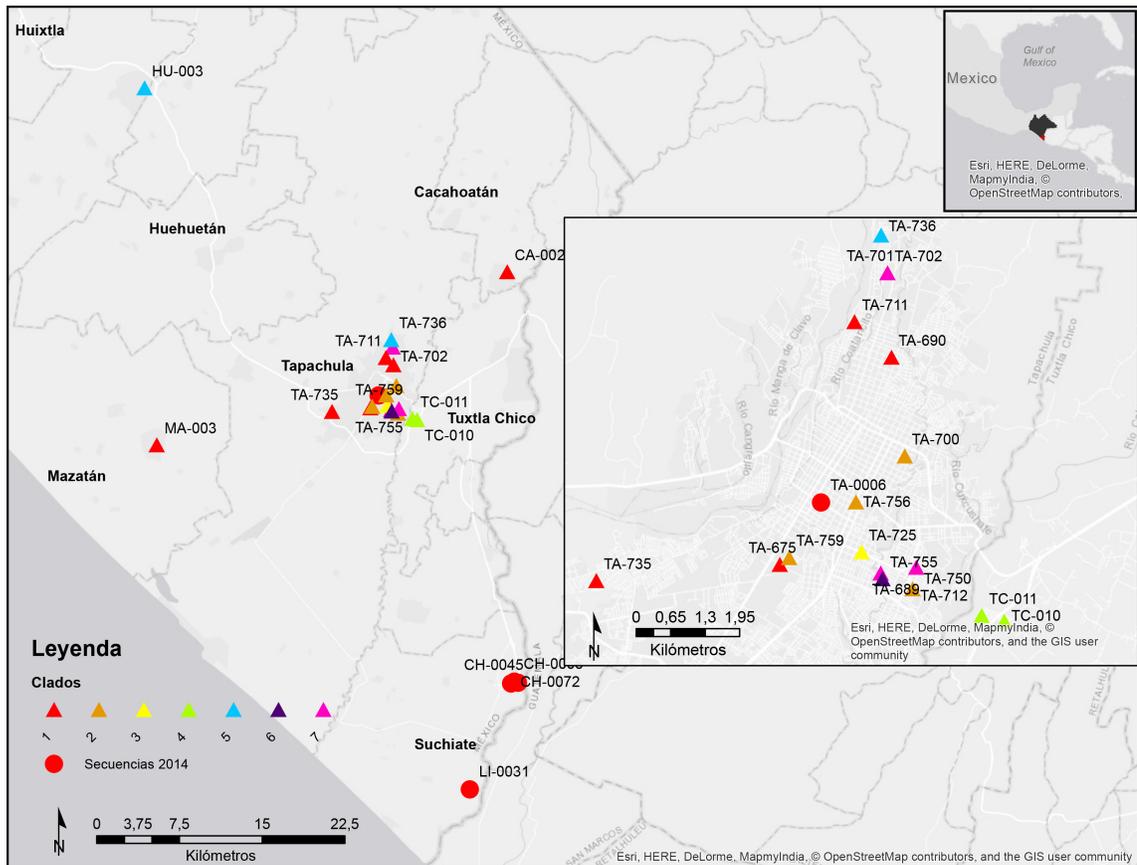


Figura 37. Distribución de los diferentes virus aislados en el estado de Chiapas. Se muestra un acercamiento a la ciudad de Tapachula y el código de colores de cada clado. Las secuencias obtenidas en el 2014 se muestran como círculo y las obtenidas en este proyecto como triángulo.

6.7 Análisis de mutaciones

Como se describió anteriormente, se encontraron dos mutaciones no sinónimas en las secuencias de E1 y una en las secuencias de E2. Cabe señalar que solamente las secuencias de Chiapas del 2014 y de las Islas Vírgenes tenían una alanina en el residuo 113 de E2. Las demás secuencias de E2 tenían valina en ese mismo residuo. Eso explica el porqué las secuencias de Chiapas del 2014 forman su propio clado cuando el gen de E2 se usa para el árbol filogenético.

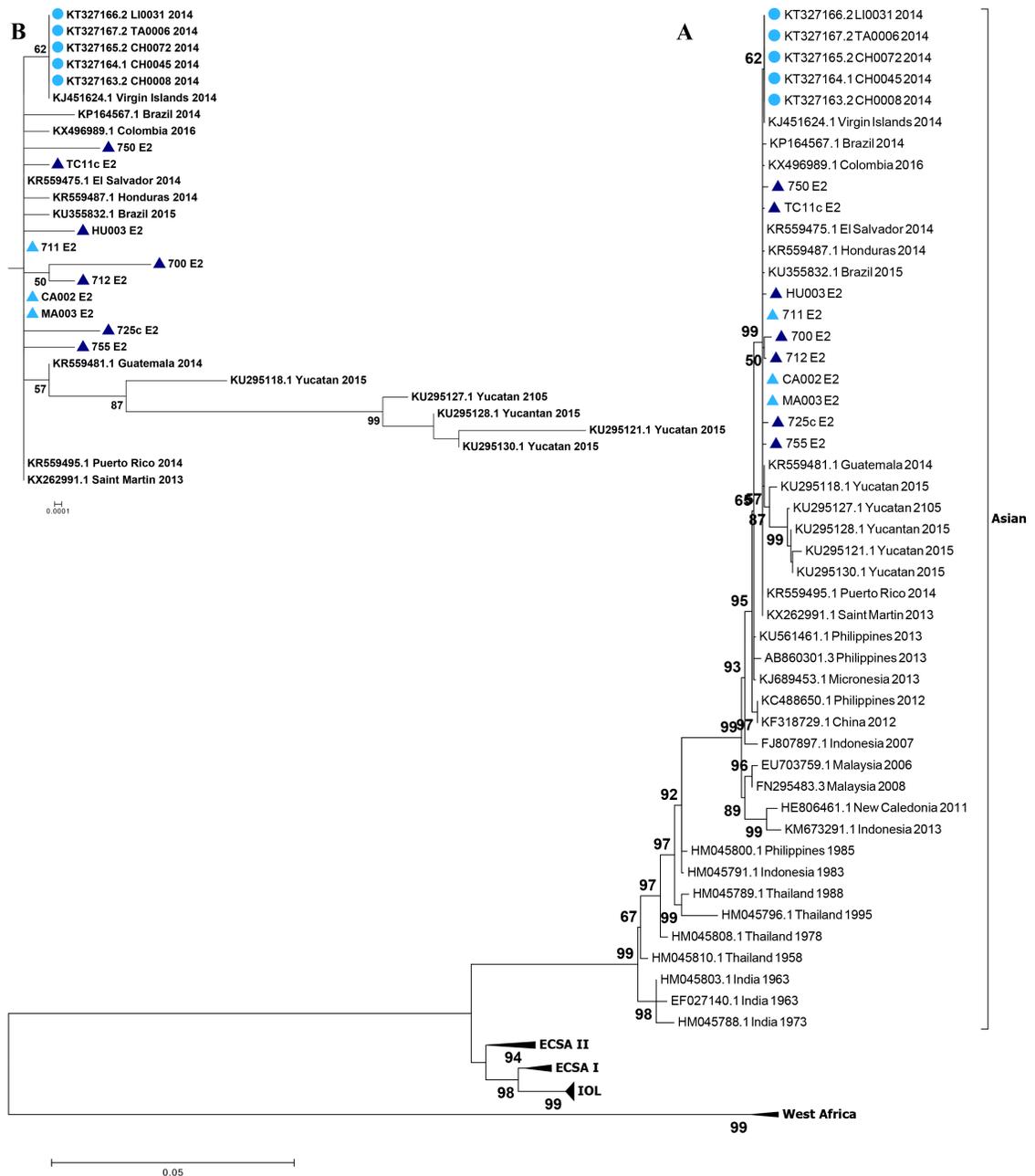
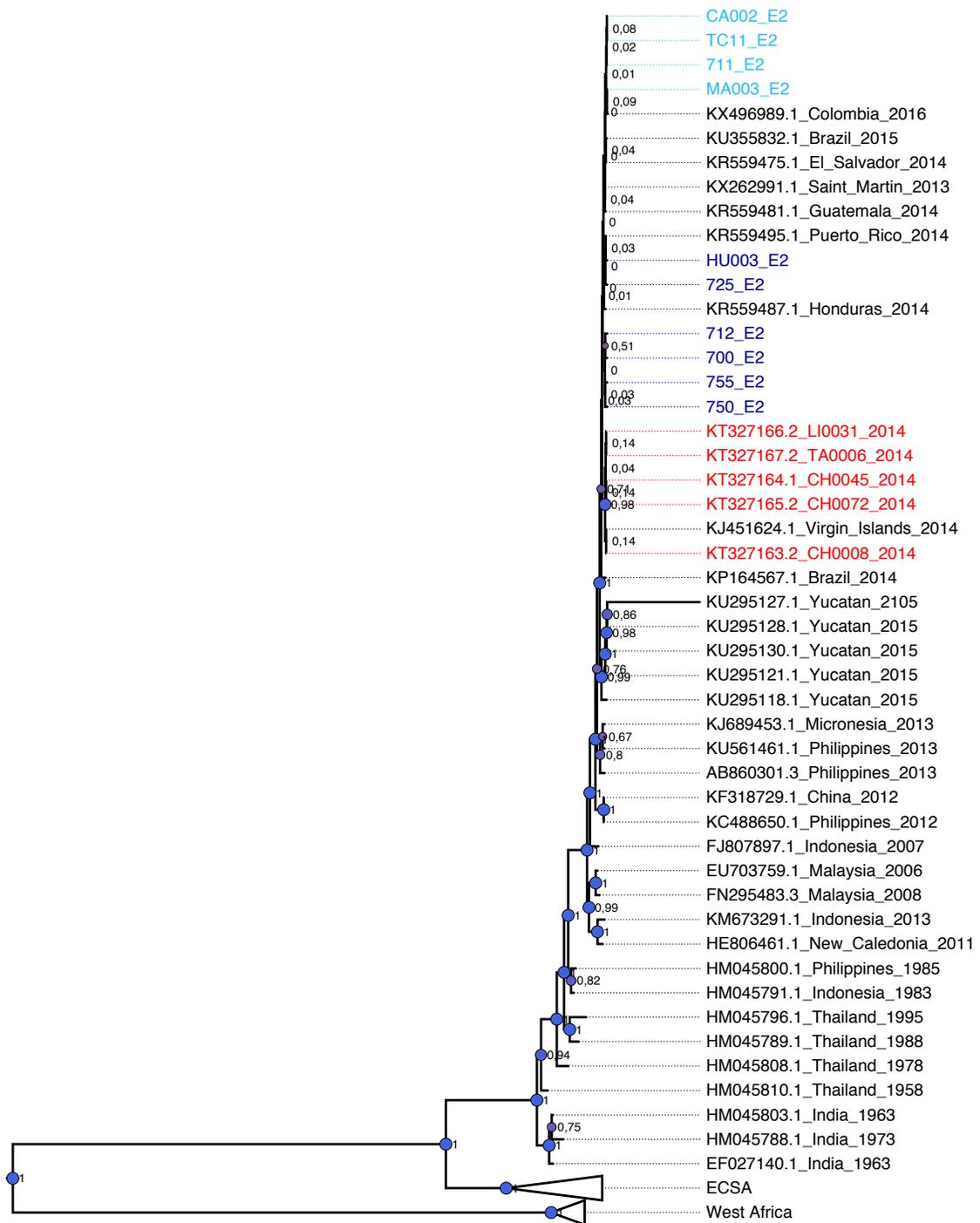


Figura 38. Reconstrucción de filogenia máxima similitud del gen E2. A) Árbol filogenético completo con los cuatro linajes. B) Acercamiento en las secuencias aisladas en América. Los círculos indican secuencias obtenidas anteriormente y los triángulos las obtenidas en este estudio. Las secuencias del grupo ancestral están en azul claro, las divergentes en azul oscuro.



7.0

Figura 39. Reconstrucción de filogenia máxima credibilidad de clado del gen E2. Se muestra el árbol completo. En los nodos se encuentra un círculo cuyo tamaño depende de la probabilidad posterior. Las secuencias del grupo ancestral están en azul claro, las divergentes en azul oscuro. Las secuencias en rojo son las anteriormente secuenciadas.

Empezando con las mutación en E1, la primera ocurrió en el cuarto residuo de la muestra TA702, provocando un cambio de valina a alanina. Esta mutación ocasionó un cambio puntual en la superficie de la proteína E1 como se muestra en la figura 40. Al parecer no afecta el plegamiento proteico.

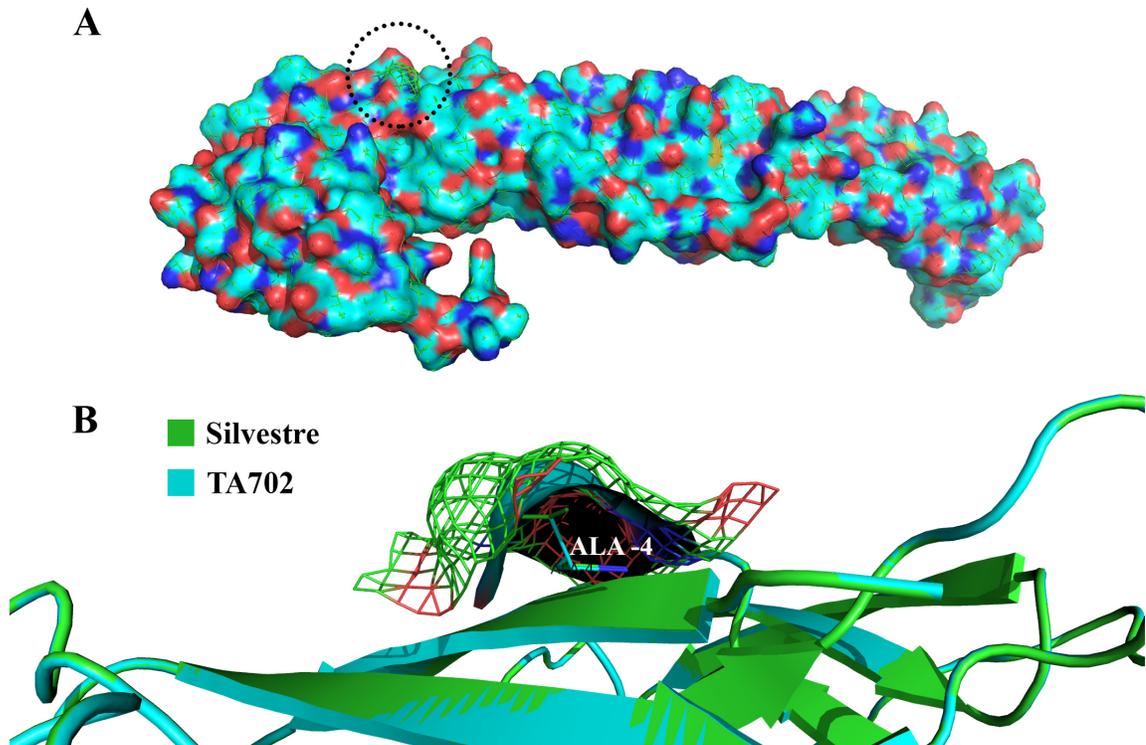


Figura 40. Modelaje de la estructura terciaria de la proteína E1 mutada (V4A) y silvestre. A) Proteína completa. El círculo señala el sitio de la mutación. B) Acercamiento al sitio de la mutación. La proteína mutada se muestra como superficie y la proteína silvestre como una malla.

La segunda mutación no sinónima en E1 ocurrió en el residuo 342 de la muestra TA725. Esta mutación provocó un cambio de alanina a valina. Sin embargo, no ocasionó un cambio en la superficie de la proteína como la mutación anterior. Esta mutación alteró la interacción entre la alanina 342 y la valina 28 como se observa en la figura 41. Se desconoce cuál puede ser el efecto de esta mutación.

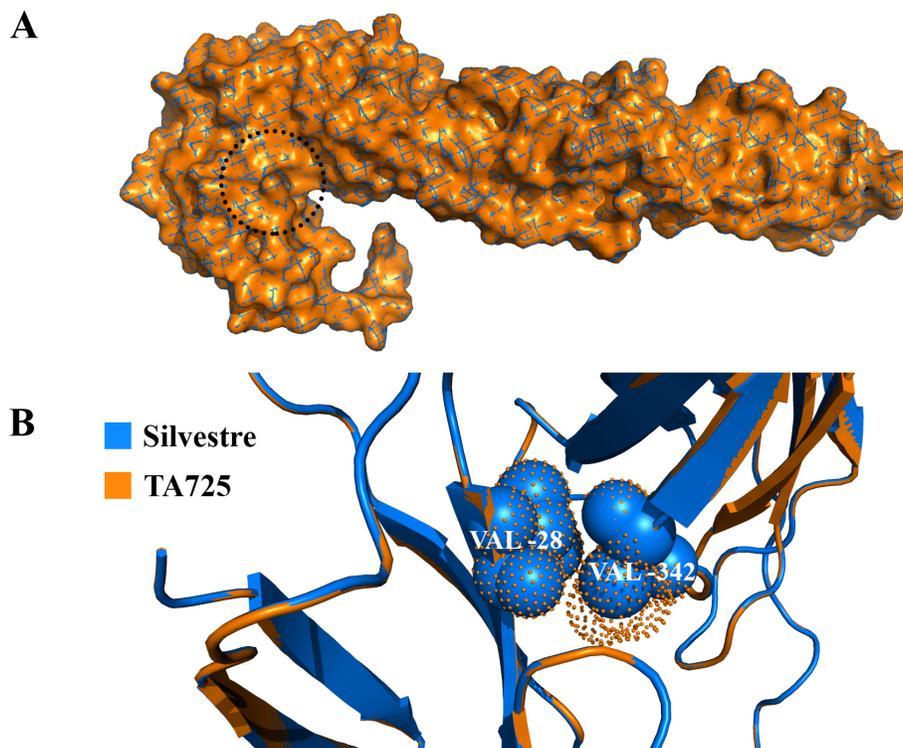


Figura 41. Modelaje de la estructura terciaria de la proteína E1 mutada (A342V) y silvestre. A) Proteína completa. El círculo señala el sitio de la mutación. B) Acercamiento al sitio de la mutación. Las cadenas laterales del residuo mutado se esquematiza como puntos y las cadenas del residuo silvestre como esfera.

La mutación no sinónima encontrada en la proteína E2 de las muestras de Chiapas 2014 e Islas Vírgenes ocurrió en el residuo 113, lo cual provocó un cambio de valina a alanina. Esta mutación tampoco ocasionó cambio en la superficie de la proteína. A su vez, la mutación afectó la interacción de este residuo con el residuo 101 de isoleucina (figura 42). Se puede observar en el panel B, como la valina logra interactuar con el residuo de isoleucina 101. Al cambiar el residuo a alanina, ésta no alcanza a interactuar con el residuo de isoleucina. Por lo tanto, pareciera que los residuos siguientes se deslizan, promoviendo un desplazamiento de la lámina β plegada sucesora.

Los virus aislados en el estado de Yucatán presentaron cinco mutaciones no sinónimas en el extremo carboxilo terminal de la proteína E2: H353A, E354D, I356Y, L357E y Y358S. Estas mutaciones no pudieron ser modeladas dado a que las proteínas cristalizadas no contenían esos residuos. Estas mutaciones explican la formación de un clado independiente, en el árbol filogenético, con buen soporte y alta probabilidad posterior.

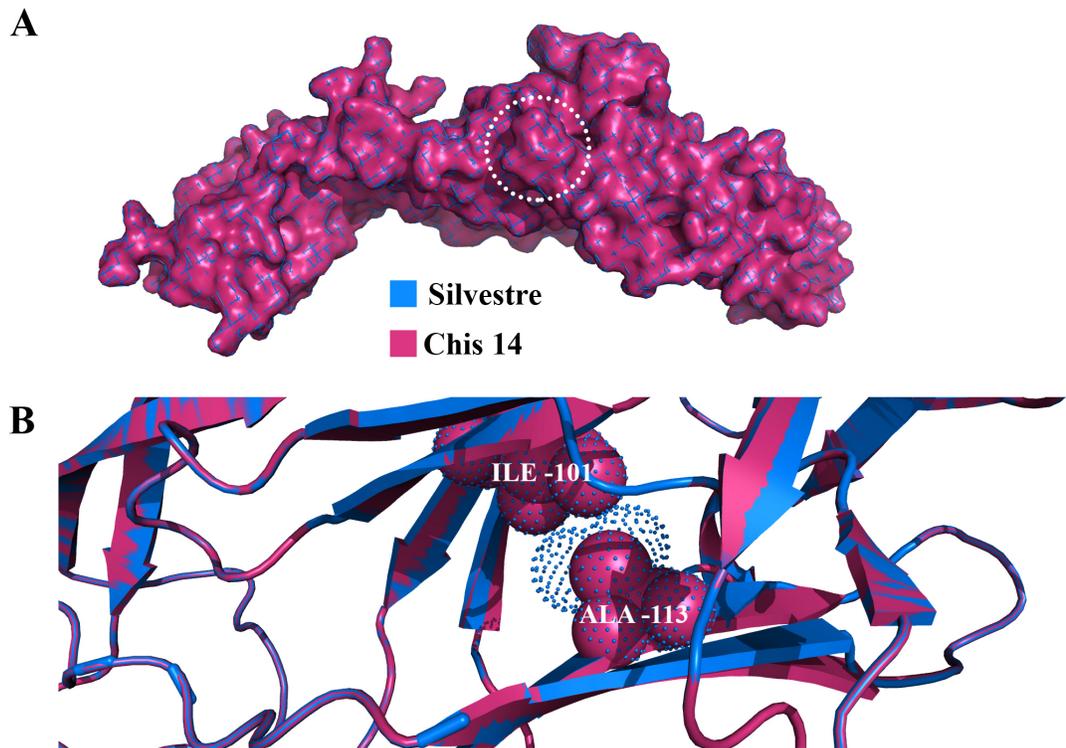


Figura 42. Modelaje de la estructura terciaria de la proteína E2 mutada (V113A) y silvestre. A) Proteína completa. El círculo señala el sitio de la mutación. B) Acercamiento al sitio de la mutación. A diferencia de la figura anterior, las cadenas laterales del residuo mutado se esquematizan como esfera y las cadenas del residuo silvestre como puntos.

6.8 Presentación clínica específica de virus

Para asociar a los virus causantes de la infección con las manifestaciones clínicas presentadas por los pacientes se hicieron diferentes grupos de virus. Primero los virus se agruparon en clados ancestrales y divergentes. Después los virus se agruparon por los clados en los que se colocaron en el árbol filogenético de E1 (clados A – G). Posteriormente se hicieron tablas de contingencia utilizando los clados como columna y las manifestaciones clínicas como filas. Para obtener la asociación se utilizó la prueba de chi cuadrado.

6.8.1 Virus ancestrales vs. divergentes

Se realizó el análisis de seis virus ancestrales y catorce virus divergentes. Las manifestaciones clínicas comunes como artralgia, mialgia, cefalea, dolor retroorbitario y escalofríos se presentaron en la misma proporción (tabla 30). Los pacientes del grupo divergente presentaron astenia en mayor proporción que el grupo ancestral, siendo estadísticamente significativo ($p < 0.05$). Se observó que los pacientes del grupo divergente presentaron mayor proporción de artritis y adenopatía; no obstante, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Los dos grupos presentaron síntomas gastrointestinales y signos hemorrágicos en la misma proporción.

Tabla 30. Manifestaciones clínicas presentadas por los grupos ancestral y divergente

Síntoma	Ancestral <i>n</i> = 6	Divergente <i>n</i> = 14	Valor de <i>p</i>
Artralgia	6 (100)	14 (100)	^a
Mialgia	6 (100)	14 (100)	^a
Cefalea	6 (100)	13 (93)	1.000
Dolor retroorbitario	2 (33)	5 (33)	1.000
Hiperemia conjuntival	3 (50)	6 (43)	1.000

Escalofrío	6 (100)	14 (100)	^a
Astenia*	2 (33)	13 (93)	0.014*
Exantema	4 (67)	6 (43)	0.628
Prurito	2 (33)	11 (77)	0.122
Artritis	2 (33)	8 (57)	0.628
Adenopatía	1 (17)	6 (43)	0.354
Vértigo	0	6 (43)	0.115
Síntomas gastrointestinales	6 (100)	14 (100)	^a
Dolor abdominal	2 (33)	7 (50)	0.642
Anorexia	5 (83)	13 (93)	0.521
Disgeusia	4 (67)	13 (93)	0.202
Diarrea	0	5 (36)	0.260
Nausea	4 (67)	12 (86)	0.549
Vómito	0	3 (21)	0.521
Signos hemorrágicos	1 (17)	1 (7)	0.521
Epistaxis	0	1 (7)	1.000
Gingivorragia	1 (17)	0	0.300

Los valores son: número (%). ^a No se calculó porque la variable es constante. Prueba exacta de Fisher. * $p < 0.05$

Los pacientes de ambos grupos presentaron artralgia generalizada de manera similar. Las articulaciones estuvieron afectadas en la misma proporción en ambos grupos. El número de articulaciones afectadas o la localización de la artralgia no es característico (tabla 31).

Tabla 31. Distribución de la artralgia en los grupos ancestral y divergente

Artralgia	Ancestral <i>n</i> = 6	Divergente <i>n</i> = 14	Valor de <i>p</i>
Hombro	4 (67)	10 (71)	1.000
Codo	4 (67)	9 (64)	1.000
Muñeca	6 (100)	13 (93)	1.00
MCF	5 (83)	11 (79)	1.000
IFP	5 (83)	10 (71)	1.000
IFD	4 (67)	9 (64)	1.000
Cadera	2 (33)	7 (50)	0.642
Rodilla	6 (100)	12 (86)	1.000
Tobillo	6 (100)	13 (93)	1.000
MTF	3 (50)	5 (36)	0.642
IF	1 (17)	4 (29)	1.000

Los valores son: número (%). MCP, metacarpofalángica; IFP, interfalángica proximal; IFD, interfalángica distal; MTF, metatarsfalángica; IF, interfalángica. Prueba exacta de Fisher.

Por lo contrario, en lo que respecta a la artritis, los pacientes del grupo divergente presentaron artritis en más articulaciones que los pacientes del grupo ancestral. Los pacientes del grupo divergente presentaron artritis en las manos y en la rodilla. Los pacientes del grupo ancestral solo en los pies (tabla 32). Aunque se muestra evidente, esta diferencia no es estadísticamente significativa.

Tabla 32. Articulaciones con artritis en los grupos ancestral y divergente

Artritis	Ancestral <i>n</i> = 6	Divergente <i>n</i> = 14	Valor de <i>p</i>
MCF	0	2 (14)	1.000
IFP	0	3 (21)	0.521
IFD	0	2 (14)	1.000
Rodilla	0	2 (14)	1.000
Tobillo	2 (33)	4 (29)	1.000
MTF	1 (17)	0	0.300

Los valores son: número (%). MCP, metacarpofalángica; IFP, interfalángica proximal; IFD, interfalángica distal; MTF, metatarsfalángica. Prueba exacta de Fisher.

Fue baja la proporción de pacientes que manifestaron exantema en los dos grupos estudiados. Sin embargo, los pacientes del grupo ancestral manifestaron una mayor proporción de exantema que los pacientes del grupo divergente (tabla 33); no obstante, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Se puede observar una tendencia en cuanto al exantema en pierna, que estuvo presente solo en el grupo ancestral.

Tabla 33. Áreas afectadas por exantema en los grupos ancestral y divergente

Área	Ancestral <i>n</i> = 6	Divergente <i>n</i> = 14	Valor de <i>p</i>
Cara	1 (17)	0	0.300
Cuello	1 (17)	0	0.300
Tórax	1 (17)	2 (14)	1.000
Abdomen	1 (17)	1 (7)	0.521
Espalda	2 (33)	1 (7)	0.202
Antebrazo	2 (33)	3 (21)	0.613
Brazo	2 (33)	2 (14)	0.549

Muslo	2 (33)	2 (14)	0.549
Pierna	2 (33)	0	0.079

Los valores son: número (%). Prueba exacta de Fisher.

En relación a la ayuda que necesitaron los pacientes para realizar sus actividades diarias, los pacientes del grupo divergente necesitaron más ayuda que los del grupo ancestral. La mitad de los pacientes del grupo divergente requirió ayuda al menos en un rubro. Solamente un paciente del grupo ancestral requirió ayuda, y fue para bañarse. Aunque la diferencia en la proporción de ayuda es evidente, no es estadísticamente significativa (figura 43 A).

Con lo que respecta al dolor, la mediana de la EVA fue de 9 en ambos grupos. Algunos pacientes del grupo ancestral reportaron dolor menor, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa. Los dos grupos de virus producen dolor en la misma proporción (figura 43 B).

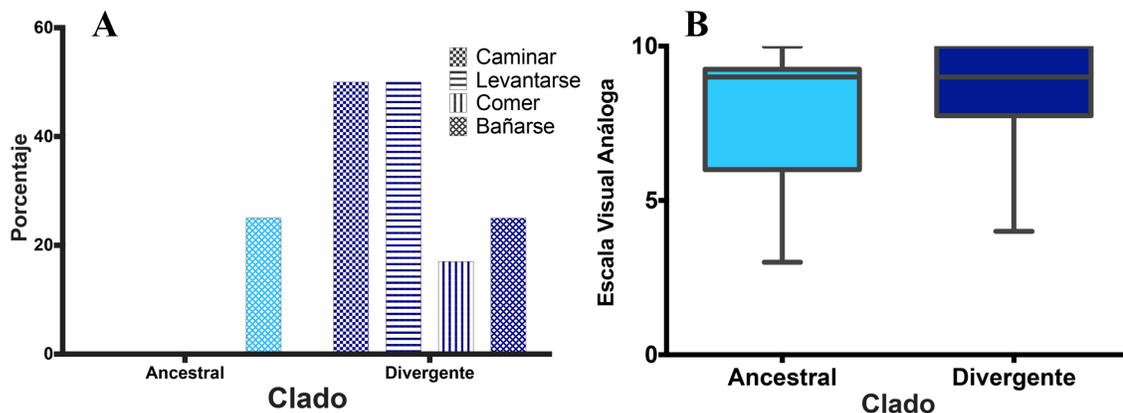


Figura 43. Distribución de ayuda y dolor presentados por los pacientes de grupos ancestral y divergente. A) Ayuda requerida por los pacientes. B) Distribución del dolor presentado por los pacientes. El grupo ancestral está marcado como azul claro y el grupo divergente como azul oscuro.

6.8.2 Virus de diferentes clados

Se agruparon a los pacientes de acuerdo a su clado en el árbol filogenético de E1. Seis pacientes formaron el clado A, cinco pacientes el clado B, un paciente el clado C, dos pacientes el clado D, dos pacientes el clado E, un paciente el clado F y tres pacientes el clado G. Todos los pacientes de los siete clados presentaron artralgia, mialgia, escalofríos y algún síntoma gastrointestinal. Las demás manifestaciones clínicas fueron variadas (tabla 34). Algunos clados solo tienen un paciente, por lo tanto las comparaciones que se hagan no son concluyentes. Comparando los clados con mayor número de pacientes, A y B, podemos observar que los pacientes del clado B presentan mayor proporción de manifestaciones clínicas. Se observa una tendencia al comparar la proporción de la astenia y el prurito en los dos grupos (Estadístico exacto de Fisher, $p = 0.061$). Hay además una mayor proporción de síntomas gastrointestinales en el clado B.

Tabla 34. Manifestaciones clínicas presentadas por los pacientes infectados con diferentes clados

Síntoma	A <i>n</i> = 6	B <i>n</i> = 5	C <i>n</i> = 1	D <i>n</i> = 2	E <i>n</i> = 2	F <i>n</i> = 1	G <i>n</i> = 3	Valor de <i>p</i>
Artralgias	100	100	100	100	100	100	100	^a
Mialgias	100	100	100	100	100	100	100	^a
Cefalea	100	100	100	50	100	100	100	0.149
Escalofríos	100	100	100	100	100	100	100	^a
Exantema	67	40	0	50	100	0	33	0.314
Hiperemia conjuntival	50	40	100	100	50	0	0	0.482
Dolor retroorbitario	33	20	0	0	50	100	67	0.116
Astenia	33	100	100	100	50	100	100	0.518
Prurito	33	100	100	50	100	100	33	0.173
Artritis	33	40	100	100	50	0	0	0.289
Adenopatía	17	40	0	100	50	0	33	0.431
Vértigo	0	40	0	0	50	0	100	0.064
Sx Gastrointestinales	100	100	100	100	100	100	100	^a
Anorexia	83	100	0	100	100	100	100	0.805
Náusea	67	100	100	50	50	100	100	0.097
Disgeusia	67	100	100	100	50	100	100	0.467

Dolor abdominal	33	40	100	50	50	0	67	0.123
Vómito	0	20	0	0	50	0	33	0.492
Diarrea	0	40	100	0	0	0	67	0.599
S Hemorrágicos	17	0	0	50	0	0	0	0.52
Gingivorragia	17	0	0	0	0	0	0	0.149
Epistaxis	0	0	0	50	0	0	0	0.873

Los valores son: %. Sx, síntomas; S, signos. ^a No se calculó estadístico porque la variable es constante. Chi-cuadrado de Pearson.

Los diferentes virus ocasionaron artralgia en diferentes proporciones (tabla 35). Los virus de los clados A, B, E y G causaron artralgia en todas las articulaciones evaluadas. Todos los pacientes infectados por el clado A (ancestrales) tuvieron artralgia en muñeca, rodilla y tobillo. Los virus del clado B ocasionaron artralgia en codo, muñeca, MCF y tobillo en la mayoría de los pacientes. El virus del clado C fue el que afectó el menor número de articulaciones. La muñeca y el tobillo fueron las articulaciones más afectadas por todos los clados, seguido por la rodilla.

Tabla 35. Artralgia presentada por los pacientes infectados con diferentes clados

Artralgia	A <i>n</i> = 6	B <i>n</i> = 5	C <i>n</i> = 1	D <i>n</i> = 2	E <i>n</i> = 2	F <i>n</i> = 1	G <i>n</i> = 3	Valor de <i>p</i>
Hombro	67	40	100	50	100	100	100	0.475
Codo	67	80	0	100	50	0	67	0.482
Muñeca	100	80	100	100	100	100	100	0.789
MCF	83	80	0	100	100	100	67	0.466
IFP	83	60	0	100	100	100	67	0.469
IFD	67	40	0	100	100	100	67	0.431
Cadera	33	40	0	0	50	100	100	0.257
Rodilla	100	60	100	100	100	100	100	0.353
Tobillo	100	80	100	100	100	100	100	0.709
MTF	50	40	0	0	50	100	33	0.692
IF	17	40	0	0	50	0	33	0.817

Los valores son: %. MCP, metacarpofalángica; IFP, interfalángica proximal; IFD, interfalángica distal; MTF, metatarsfalángica; IF, interfalángica. Chi-cuadrado de Pearson.

No todos los clados causaron artritis en los pacientes que infectaron. Pareciera que los virus del clado A no son tan artritogénicos, ya que solamente afectaron dos articulaciones en baja proporción. A su vez, lo virus del clado B, D y E también afectaron solamente a dos articulaciones. Al contrario del paciente infectado con el virus del clado C. Este paciente presentó artritis en manos, rodillas y tobillos. El virus del clado C afectó el mayor número de articulaciones. Los virus del clado F y G no causaron artritis en los pacientes (tabla 36). Los virus del clado C y D se asociaron a la presencia de artritis en MCF e IFP, siendo estadísticamente significativo. Asimismo, los virus del clado C y D se asociaron con la presencia de artritis en rodilla.

Tabla 36. Artritis presentada por los pacientes infectados con diferentes clados

Articulación	A <i>n</i> = 6	B <i>n</i> = 5	C <i>n</i> = 1	D <i>n</i> = 2	E <i>n</i> = 2	F <i>n</i> = 1	G <i>n</i> = 3	Valor de <i>p</i>
MCF *	0	0	100	50	0	0	0	0.025*
IFP **	0	0	100	100	0	0	0	0.003*
IFD	0	20	100	0	0	0	0	0.085
Rodilla *	0	0	100	0	50	0	0	0.025*
Tobillo	33	40	100	0	50	0	0	0.475
MTF	17	0	0	0	0	0	0	0.873

Los valores son: %. MCP, metacarpofalángica; IFP, interfalángica proximal; IFD, interfalángica distal; MTF, metatarsofalángica. Chi-cuadrado de Pearson. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Solamente los virus de los clados A, B y E provocaron exantema en los pacientes (tabla 37). Los virus del clado A fueron los que ocasionaron exantema generalizado en los pacientes. Los virus del clado B y E ocasionaron exantema en menores áreas del cuerpo. Se demuestra que el exantema no es característico de la fiebre por CHIKV.

Tabla 37. Exantema presentado por los pacientes infectados con diferentes clados

Localización	A n = 6	B n = 5	C n = 1	D n = 2	E n = 2	F n = 1	G n = 3	Valor de p
Cara	17	0	0	0	0	0	0	0.873
Cuello	17	0	0	0	0	0	0	0.873
Tórax	17	20	0	0	50	0	0	0.775
Abdomen	17	20	0	0	0	0	0	0.933
Antebrazo	33	40	0	0	50	0	0	0.701
Brazo	33	20	0	0	50	0	0	0.738
Muslo	33	20	0	0	50	0	0	0.738
Pierna	33	0	0	0	0	0	0	0.52
Espalda	33	20	0	0	0	0	0	0.775

Los valores son: %. Chi-cuadrado de Pearson.

Se observa que no todos los virus incapacitan al paciente (figura 44 A). De los pacientes infectados con el clado A, solamente el 25% requirió ayuda para bañarse. La mayoría de los pacientes infectados con el clado B requirió ayuda para al menos una actividad. El paciente infectado con el clado C requirió ayuda para todo. La mitad de los pacientes de los clados D y G requirieron ayuda para sentarse y caminar, respectivamente. Los virus del clado E no causaron incapacidades.

El valor de la escala visual análoga tuvo variación de acuerdo a los clados infectantes (figura 44 B). Los pacientes infectados con el clado A tuvieron una mediana de 9 puntos y un rango de 7. Los pacientes del clado D se comportaron de manera similar con una mediana de 7 puntos y un rango de 6. Los pacientes infectados con los clados E y G tuvieron una mediana de 9.5 y 9, respectivamente, y un rango de 1. Los pacientes infectados con el clado B tuvieron una mediana de 8 puntos y un rango de 3. Puede observarse que los clados C, E, F y G causaron mayor dolor. Sin embargo, como estos clados tenían pocos pacientes, esta información no es concluyente. Es interesante mencionar que el virus del clado C es el que contenía la mutación A342V en E1.

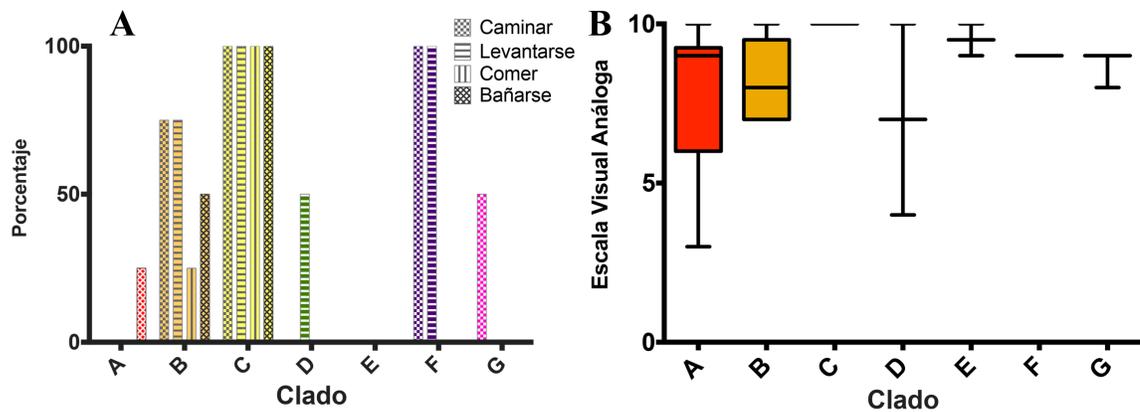


Figura 44. Distribución de ayuda y dolor presentados por los pacientes infectados con diferentes clados. A) Ayuda requerida por los pacientes. B) Distribución del dolor presentado por los pacientes.

6.8.3 Detección de diferentes virus en el mismo domicilio

El 26 de junio de 2015 acudieron a consultar un padre de familia (TA701) y su hijo (TA702). La fecha de inicio de síntomas fue la misma, 3 días antes de acudir. Los dos desempeñaban la misma ocupación, electricista. Después de aislar y secuenciar los virus se determinó que el virus que infectó al padre pertenece al clado B y el virus que infectó al hijo pertenece al “clado” G. Al analizar las manifestaciones clínicas, ambos pacientes presentaron artralgia, mialgia, cefalea, escalofríos, astenia, prurito, náusea, disgeusia y anorexia. Solamente el padre reportó hiperemia conjuntival y diarrea. El hijo reportó dolor retroorbitario, adenopatía, vértigo, vómito y dolor abdominal. En cuanto a la distribución de la artralgia, el padre solamente reportó artralgia en los codos. Al contrario, el hijo reportó artralgia generalizada (figura 45). Ninguno de los dos presentó exantema o artritis. El padre refirió un dolor de 9 puntos y el hijo de 8. El padre requirió ayuda para todo. En cambio el hijo solo requirió ayuda para caminar.

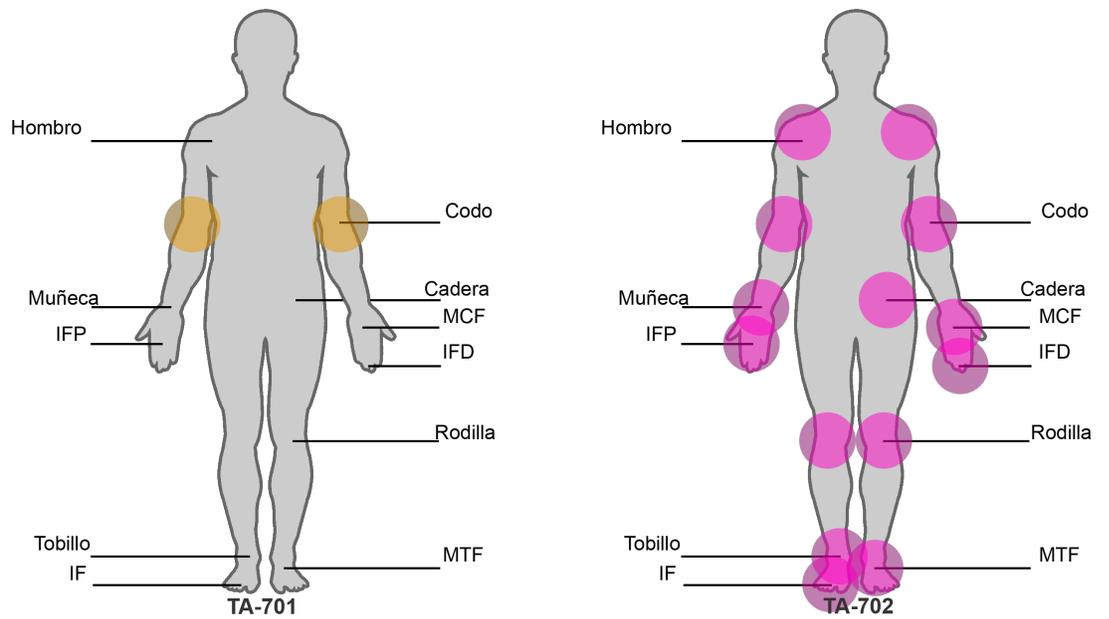


Figura 45. Distribución de la artralgia presentada por el padre y el hijo.

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN

Se pudieron identificar 52 pacientes confirmados con fiebre por CHIKV en etapa aguda en ocho diferentes municipios del estado de Chiapas. En promedio se observaron 4.7 pacientes confirmados por día, de lunes a viernes. Los pacientes que buscaron atención médica eran de personas de mediana edad. Encontramos una alta proporción de mujeres afectadas como ya había sido reportado por Danis-Lozano [49]. Esto pudo deberse a la transmisión de CHIKV en el ambiente domiciliario, como se ha descrito previamente en reportes de seroprevalencia de dengue [66]. Puede existir también una explicación social. Thompson reportó que las mujeres acudieron con el médico en más ocasiones que los hombres [67].

Cuando se aplicó un cerco de 200 m alrededor del domicilio de los pacientes infectados se formaron grupos de domicilios infectados; por lo contrario, también había casas aisladas. Esto puede deberse a que los vecinos de los pacientes no fuesen trabajadores del estado y por lo tanto no ser captados por nosotros. Existen estudios de Colombia y Honduras donde utilizan el sistema de información geográfica para estimar la incidencia y los patrones de transmisión de CHIKV. Ellos reportan mapas de los municipios afectados de todo Colombia y Honduras [68–71]. Sin embargo, somos el primer estudio donde se geolocalizan de manera individual los casos confirmados y se asocian con la variedad del virus identificado.

En relación a las manifestaciones clínicas presentadas por los pacientes evaluados, la artralgia, cefalea y escalofríos se presentó en proporciones similares que en los demás estudios realizados en México [47–49]. Solo se reportó artritis y adenopatía en pacientes de Chiapas. No creemos que estas manifestaciones sean específicas para la población o el virus. Debido a que la información analizada por Garay-Morán venía de una base de datos preestablecida, donde probablemente no se incluyó la artritis [48]. Los pacientes de Yucatán pudieron haber presentado artritis, pero no fue tomado en cuenta o

no se buscó. Se ha reportado artritis en pacientes infectados con virus de los linajes ECSA, IOL y Asiático [20–22,72–78], así que en México, no podía ser la excepción. La adenopatía fue previamente reportada en Reunión [21,22], India [79,80] y Sri Lanka [75,81], donde el linaje del Océano Índico estaba circulando. En el continente Americano, Colombia y Granada [78,82] reportaron pacientes con adenopatía; así como pacientes españoles que visitaron República Dominicana o Haití [83]. Solamente dos reportes mencionan la localización de los nódulos linfáticos afectados, siendo los cervicales los más comúnmente afectados [79,83]. En nuestro estudio encontramos adenopatía retro auricular, la cual puede ser vista como inflamación del oído externo. Javelle reportó inflamación del oído externo en pacientes con infección aguda por CHIKV en Malasia. Ellos sugieren la búsqueda de inflamación en el oído externo en los pacientes con sospecha de fiebre por CHIKV [84]. Probablemente CHIKV se puede diseminar de los ganglios linfáticos retroauriculares al oído externo, o viceversa.

Observamos una proporción mayor de pacientes con signos hemorrágicos comparado con los demás pacientes infectados con el linaje Asiático. Esta diferencia en la proporción es estadísticamente significativa. No se había reportado con anterioridad una proporción tan alta de manifestaciones hemorrágicas en la población mexicana. No obstante, no somos los únicos en reportar una gran proporción de signos hemorrágicos. Staikowsky reportó signos hemorrágicos en 28% de los pacientes evaluados en Reunión [21]. Además desde los años sesenta, ya se habían reportado manifestaciones hemorrágicas en pacientes de la India [85,86]. Por lo tanto, debemos considerar a la fiebre Chikungunya como un posible diagnóstico al enfrentarnos a una fiebre hemorrágica.

En este estudio reportamos una mayor proporción de articulaciones afectadas por artralgia. En la población estudiada, la artralgia en hombro, muñeca, metacarpofalángicas, cadera, rodilla y tobillo se presentó en mayor proporción que en los pacientes evaluados en Reunión, India, Sri Lanka, Congo y Gabón [21,74,75,87,88]. De manera contraria, los pacientes evaluados en este estudio presentaron artralgia cervical en menor proporción. La proporción de artralgia en codo, interfalángicas

proximales y metatarsofalángicas se presentó de manera similar que en los estudios previos [20,22,87]. Los pacientes estudiados presentaron menor proporción de áreas afectadas por exantema, cuando fueron comparados con los pacientes de la India y Reunión [21,89]. Solamente el exantema en brazo, antebrazo y muslos se presentó de igual manera que en estudios previos.

Los pacientes con infección confirmada por CHIKV referían mayor cantidad de dolor que los pacientes con EFAI, lo cual se confirmó en el análisis multivariado. Además las mujeres reportaron mayor dolor que los hombres. Esto se puede deber a que las mujeres tienen mayor sensibilidad al dolor, comparado con los hombres, para la mayoría de las modalidades experimentales del dolor [90].

Somos los primeros en reportar artralgia crónica por CHIKV en la población mexicana después de 14 meses de inicio de los síntomas. Los pacientes evaluados llegaron a tener un periodo libre de artralgia; no obstante, el dolor regresó. La artralgia en mano se resolvió, pero la artralgia en rodilla permaneció por la totalidad del tiempo evaluado. La proporción de articulaciones afectadas por artralgia a los 14 meses difiere con los reportado por Schilte [91]. Cincuenta porciento de los pacientes evaluados por Schilte en la isla de Reunión reportaron artralgia en mano, rodilla y tobillo después de 14 meses de inicio de los síntomas; sin embargo, Schilte evaluó a 76 pacientes, dando solidez a su trabajo. En este estudio, solamente se lograron entrevistar por teléfono a cuatro de los 52 pacientes después de 14 meses. Cuando tratamos de contactar a los pacientes, los números telefónicos resultaron equivocados, nunca contestaron o se rehusaron a ser entrevistados. Esta información se incluyó para que quedara evidencia de que en la población mexicana, la artralgia puede continuar al menos por 14 meses después del inicio de los síntomas. Los virus aislados de los cuatro pacientes con dolor crónico fueron divergentes; a pesar de ello, esto no es particularidad de los virus mexicanos. Esto debido a que virus, catalogados en este estudio como ancestrales, han provocado dolor crónico en pacientes Colombianos [92–94].

Investigamos la posibilidad de utilizar combinaciones de manifestaciones clínicas para poder diferenciar pacientes con CHIKF y EFAI. La combinación que toma en cuenta artralgia en muñeca, metacarpofalángicas y rodilla tiene mejor especificidad. La combinación de artralgia en esos mismos lugares más adenopatía, artritis y más de 30 articulaciones con artralgia tiene mayor valor predictivo negativo. Estas dos combinaciones podrán servir diagnosticar fiebre por CHIKV con base en la clínica, donde no se cuente con métodos de diagnóstico. Es importante establecer un diagnóstico para poder dar tratamiento oportuno y estratificar a los pacientes por gravedad. Además se pueden diseñar aplicaciones para dispositivos móviles donde se puede alimentar con los datos clínicos del paciente y obtener un pronóstico acerca de la probabilidad de tener CHIKF.

Solo existen seis estudios, aparte del nuestro, donde se reportan las enzimas de función de hepática de un grupo de pacientes con infección confirmada por CHIKV. Dos de Reunión [20,22], dos de Singapur [95,96], uno de Gabón [97] y uno de Chiapas [49]. Los seis estudios reportan la concentración de ALT y AST. Dos reportan la concentración de GGT, uno de Reunión [20] y otro de México [49]. A su vez, solo dos estudios reportan la concentración de fosfatasa alcalina; uno de México [49] y el otro de Singapur [95].

La mayor concentración de AST se encontró en los pacientes de Reunión [20,22], seguido por los pacientes de Singapur [95,96]. La concentración de AST de los pacientes estudiados en este reporte fue igual que la reportada por los pacientes de Gabón [97]. Se comparó la concentración de AST de los pacientes confirmados por RT-qPCR de la cohorte de Danis-Lozano [49] con la nuestra. Se observó que el 75% de los pacientes de la cohorte de Danis-Lozano tuvo concentraciones de AST menores a 42 U/L (valores normales: <37 U/L). Al contrario de nuestra cohorte, donde el 75% de los pacientes tuvo concentraciones menores a 65 U/L. Se observó el mismo patrón cuando se compararon los grupos confirmados por IgM; no obstante, la diferencia solo fue de 4 U/L.

Al igual que con la AST, la ALT se encontró en mayor concentración en los pacientes de Reunión [20,22], seguido por los pacientes de Singapur [95,96]. Además, los pacientes de Gabón reportaron concentraciones iguales a las de nuestra cohorte [97]. Cuando se compararon las concentraciones de ALT de las dos cohortes de Chiapas, se observó que casi el 75% de los pacientes del grupo RT-qPCR evaluado por Danis-Lozano [49] tuvo valores mayores a los de referencia (valores normales: <41 U/L). Al contrario, el 73% de nuestros pacientes tuvo concentraciones de ALT menores a la referencia. Se observó el mismo patrón con los grupos IgM de ambos estudios.

La concentración de GGT reportada por Borgherini, de Reunión [20], fue similar a la reportada por Danis-Lozano [49]. El 75% de los pacientes del grupo RT-qPCR reportados por Danis-Lozano tuvieron concentraciones de GGT mayores a los límites de referencia (valores normales: <50 U/L). De nuestros pacientes del grupo RT-qPCR solo el 27% tuvieron concentraciones superiores a los límites de referencia. Lo mismo se observó cuando se compararon los grupos IgM, el 75% de la cohorte de Danis-Lozano tuvo valores superiores a los de referencia. El 75% de nuestra cohorte tuvo valores normales.

La concentración de ALP reportada por Lee, de Singapur [95], fue similar a la encontrada en nuestra cohorte. El 50% de los pacientes del grupo RT-qPCR de la cohorte de Danis-Lozano [49] tuvo concentraciones de ALP mayores a los límites de referencia (valores normales: 43 – 115 U/L). Al contrario, el 13% de los pacientes del grupo RT-qPCR de nuestra cohorte tuvo concentraciones mayores a los límites de referencia. Se observó este mismo patrón en el grupo IgM.

La concentración de bilirrubinas: total, directa e indirecta, se encontraron en su mayoría dentro de los parámetros normales (bilirrubina total: 0.3 – 1.2 mg/dL; bilirrubina directa: 0.0 – 0.3 mg/dL). No hubo diferencia entre los pacientes de ambos grupos (RT-qPCR e IgM) de la cohorte de Danis-Lozano y la de nosotros [49].

En relación al colesterol, se observó que el 25% de los pacientes del grupo RT-qPCR de la cohorte de Danis-Lozano [49] tuvieron concentraciones menores al límite inferior (valores normales: 140 – 200 mg/dL). Nosotros observamos que el 47% de los pacientes del grupo RT-qPCR tuvieron concentraciones menores al límite superior. Esto se repitió en los pacientes del grupo IgM, donde el 25% de ellos tuvo concentraciones de colesterol más bajas que el límite inferior. En nuestra cohorte, observamos que el 37% de los pacientes del grupo IgM reportó tener concentraciones de colesterol menores al límite inferior. En nuestra cohorte, los pacientes del grupo RT-qPCR tuvieron menor concentración de colesterol comparado con el grupo IgM. Esto podría ser un indicio de que el colesterol es útil para el virus en la etapa aguda de la infección. Esto ya se había descrito de manera *in vitro*, donde demostraron que la infección por CHIKV se detiene cuando el colesterol se eliminaba de la célula con β metil ciclodextrina [98]. Además existen otros estudios donde se reporta el uso del colesterol por parte de CHIKV para ingresar a la célula [99,100].

Los virus que afectaron a los pacientes evaluados fueron aislados y secuenciados. Se asoció la presencia de las cepas virales aisladas y las diferentes manifestaciones clínicas. Se confirmó que el virus circulante en Chiapas pertenecía al linaje Asiático y fue el responsable del brote. No se encontraron virus del linaje ECSA, el cual se encontraba circulando en Brasil. Además no se encontró la mutación adaptativa en E1, (A266V), la cual confiere ventaja adaptativa en mosquitos *A. albopictus*.

Encontramos diferentes cepas de CHIKV circulando en el estado de Chiapas. Esto puede explicarse a que se aislaron los virus durante el brote, cuando hay una mayor cantidad de infecciones. Dos de las secuencias se agruparon con las cepas reportadas en Yucatán. Se desconoce la fecha de colecta de las muestras de Yucatán, así que solo se puede inferir que los virus estuvieron circulando en los dos estados. Sería interesante secuenciar virus de los años siguientes para poder determinar cuál o cuáles clados fueron los que permanecieron.

Uno esperaría que un mismo virus fuera el responsable de las infecciones en un grupo de domicilios vecinos. Sin embargo, eso no fue el caso con las muestras TA689 y TA755, las cuales compartían el mismo grupo de domicilios vecinos pero no el clado al que pertenecían.

Este es el primer estudio donde se compara las manifestaciones clínicas con la variabilidad genética dentro del mismo linaje. El paciente infectado con el virus que contenía la mutación no sinónima A342V tuvo ciertas particularidades. Aunque los dos aminoácidos, alanina y valina, tienen una cadena lateral hidrofóbica, su efecto en la proteína viral y su interacción con el hospedero aún está por definir.

Este estudio tiene sus limitaciones. Solo obtuvimos pacientes de un hospital que brinda servicio a una población en específica. La clínica pertenece al ISSSTE y solo atiende a trabajadores del estado y sus familiares directos, no abierto a la población en general. Por lo tanto la muestra no fue representativa para la población en general. Además el número de pacientes negativos a fiebre Chikungunya era bajo para poder realizar asociaciones fuertes y poder diferenciar a la fiebre por CHIKV de manera eficiente. No fue posible identificar el agente etiológico de las enfermedades febriles agudas indiferenciadas. Probablemente los virus fueron eliminados en los primeros días de inicio de los síntomas, antes de que los pacientes buscaran atención médica. Otra posibilidad es que los pacientes presentaran sintomatología leve e inespecífica, lo cual los llevó a acudir muy tarde para la detección de ARN viral. No fue posible evaluar a todos los grupos de infección, dado que la mayoría estaban compuestos de pacientes confirmados por ELISA, cuando ya no hay ARN viral en sangre.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIÓN

Se logró describir de manera detallada las manifestaciones clínicas presentadas por los pacientes del sur de México infectados con CHIKV. Encontramos mayor proporción de pacientes afectados por artralgia en extremidades superiores que los pacientes de África y Asia infectados con los virus ECSA e IOL, respectivamente. En cambio encontramos menos artritis y exantema que lo reportado en otras poblaciones.

Además se propusieron dos combinaciones de manifestaciones clínicas para poder distinguir la fiebre por CHIKV de las enfermedades febriles agudas indiferenciadas. Esta combinaciones ayudarán a establecer el diagnóstico en áreas donde pruebas serológicas o moleculares no están disponibles y poder dar tratamiento oportuno.

Se identificó la circulación de varias cepas de CHIKV, que existe variabilidad genética en los virus secuenciados y que los virus divergentes causaron un mayor espectro de manifestaciones clínicas. En consecuencia, se necesitan más estudios para definir la participación de las variantes de CHIKV en presentación clínica.

CAPÍTULO 9

REFERENCIAS

1. Weaver, S. C.; Lecuit, M. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 1231–1239.
2. Laras, K.; Sukri, N. C.; Larasati, R. P.; Bangs, M. J.; Kosim, R.; Djauzi; Wandra, T.; Master, J.; Kosasih, H.; Hartati, S.; Beckett, C.; Sedyaningsih, E. R.; Beecham, H. J.; Corwin, A. L. Tracking the re-emergence of epidemic chikungunya virus in Indonesia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2005**, *99*, 128–41.
3. Pan American Health Organization Chikungunya: Data, Maps and Statistics
Disponibile en:
http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=5927&Itemid=40931&lang=en (consultado nov 14, 2017).
4. Dirección General de Epidemiología Boletín Epidemiológico - Semana 44, 2017
Disponibile en:
<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/272138/sem44.pdf> (consultado nov 14, 2017).
5. Dirección General de Epidemiología Boletín Epidemiológico - Semana 36, 2017
Disponibile en:
<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257040/sem36.pdf> (consultado nov 21, 2017).
6. Powers, A. M. Chikungunya. *Clin. Lab. Med.* **2010**, *30*, 209–219.
7. Solignat, M.; Gay, B.; Higgs, S.; Briant, L.; Devaux, C. Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. *Virology* **2009**, *393*, 183–197.
8. Kuhn, R. J. Togaviridae. En *Field's Virology*; Knipe, D., Howley, P., Eds.; Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, 2013; pp. 629–50.
9. Wintachai, P.; Wikan, N.; Kuadkitkan, A.; Jaimipuk, T.; Ubol, S.; Pulmanusahakul, R.; Auewarakul, P.; Kasinrerak, W.; Weng, W.-Y.; Panyasrivanit, M.; Paemanee, A.; Kittisenachai, S.; Roytrakul, S.; Smith, D. R.

- Identification of prohibitin as a Chikungunya virus receptor protein. *J. Med. Virol.* **2012**, *84*, 1757–1770.
10. Schwartz, O.; Albert, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 491–500.
 11. 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. *PLoS Negl Trop Dis* **2013**, *7*, e2004.
 12. Leung, J. Y.-S.; Ng, M. M.-L.; Chu, J. J. H. Replication of Alphaviruses: A Review on the Entry Process of Alphaviruses into Cells. *Adv. Virol.* **2011**, *2011*, 1–9.
 13. Caglioti, C.; Lalle, E.; Castilletti, C.; Carletti, F.; Capobianchi, M. R.; Bordi, L. Chikungunya virus infection: an overview. *New Microbiol.* **2013**, *36*, 211–27.
 14. Powers, A. M.; Brault, A. C.; Shirako, Y.; Strauss, E. G.; Kang, W.; Strauss, J. H.; Weaver, S. C. Evolutionary Relationships and Systematics of the Alphaviruses. *J. Virol.* **2001**, *75*, 10118–10131.
 15. Tsetsarkin, K. A.; Vanlandingham, D. L.; McGee, C. E.; Higgs, S. A Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential. *PLoS Pathog.* **2007**, *3*, e201.
 16. Nunes, M. R. T.; Faria, N. R.; de Vasconcelos, J. M.; Golding, N.; Kraemer, M. U.; de Oliveira, L. F.; da Silva Azevedo, R. do S.; da Silva, D. E. A.; da Silva, E. V. P.; da Silva, S. P.; Carvalho, V. L.; Coelho, G. E.; Cruz, A. C. R.; Rodrigues, S. G.; da Silva Gonçalves Vianez, J. L.; Nunes, B. T. D.; Cardoso, J. F.; Tesh, R. B.; Hay, S. I.; Pybus, O. G.; da Costa Vasconcelos, P. F. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med.* **2015**, *13*, 102.
 17. Chen, R.; Puri, V.; Fedorova, N.; Lin, D.; Hari, K. L.; Jain, R.; Rodas, J. D.; Das, S. R.; Shabman, R. S.; Weaver, S. C. Comprehensive Genome-Scale Phylogenetic Study Provides New Insights on the Global Expansion of Chikungunya Virus. *J. Virol.* **2016**.
 18. Leparç-Goffart, I.; Nougairède, A.; Cassadou, S.; Prat, C.; de Lamballerie, X. Chikungunya in the Americas. *Lancet* **2014**, *383*, 514.

19. Pialoux, G.; Gaüzère, B.-A.; Jauréguiberry, S.; Strobel, M. Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *Lancet Infect. Dis.* **2007**, *7*, 319–327.
20. Borgherini, G.; Poubeau, P.; Staikowsky, F.; Lory, M.; Le Moullec, N.; Becquart, J. P.; Wengling, C.; Michault, A.; Paganin, F. Outbreak of chikungunya on Reunion Island: early clinical and laboratory features in 157 adult patients. *Clin Infect Dis* **2007**, *44*, 1401–1407.
21. Staikowsky, F.; Le Roux, K.; Schuffenecker, I.; Laurent, P.; Grivard, P.; Develay, A.; Michault, A. Retrospective survey of Chikungunya disease in Réunion Island hospital staff. *Epidemiol. Infect.* **2008**, *136*, 196–206.
22. Staikowsky, F.; Talarmin, F.; Grivard, P.; Souab, A.; Schuffenecker, I.; Le Roux, K.; Lecuit, M.; Michault, A. Prospective study of Chikungunya virus acute infection in the Island of La Reunion during the 2005-2006 outbreak. *PLoS One* **2009**, *4*, e7603.
23. Economopoulou, A.; Dominguez, M.; Helynk, B.; Sissoko, D.; Wichmann, O.; Quenel, P.; Germonneau, P.; Quatresous, I. Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005–2006 outbreak on Réunion. *Epidemiol. Infect.* **2009**, *137*, 534.
24. Pan American Health Organization *Preparedness and Response for Chikungunya Virus Introduction in the Americas*; Pan American Health Organization: Washington, D.C., 2011;
25. Panning, M.; Grywna, K.; van Esbroeck, M.; Emmerich, P.; Drosten, C. Chikungunya Fever in Travelers Returning to Europe from the Indian Ocean Region, 2006. *Emerg. Infect. Dis.* **2008**, *14*, 416–422.
26. Lanciotti, R. S.; Kosoy, O. L.; Laven, J. J.; Panella, A. J.; Velez, J. O.; Lambert, A. J.; Campbell, G. L. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. *Emerg. Infect. Dis.* **2007**, *13*, 764–7.
27. Santiago, G. A.; Vázquez, J.; Courtney, S.; Matías, K. Y.; Andersen, L. E.; Colón, C.; Butler, A. E.; Roulo, R.; Bowzard, J.; Villanueva, J. M.; Muñoz-Jordan, J. L. Performance of the Triplex real-time RT-PCR assay for detection of Zika, dengue, and chikungunya viruses. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1391.
28. Drebot, M. A.; Valadere, A. M.; Goodman, C. H.; Johnson, B. W.; de Salazar, P.

- M.; Holloway, K. Evaluation of Commercially Available Chikungunya Virus Immunoglobulin M Detection Assays. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2016**, *95*, 182–192.
29. Martin, D. A.; Muth, D. A.; Brown, T.; Johnson, A. J.; Karabatsos, N.; Roehrig, J. T. Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections. *J. Clin. Microbiol.* **2000**, *38*, 1823–6.
 30. Javelle, E.; Ribera, A.; Degasne, I.; Gaüzère, B.-A.; Marimoutou, C.; Simon, F. Specific Management of Post-Chikungunya Rheumatic Disorders: A Retrospective Study of 159 Cases in Reunion Island from 2006-2012. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, e0003603.
 31. Weaver, S. C.; Osorio, J. E.; Livengood, J. A.; Chen, R.; Stinchcomb, D. T. Chikungunya virus and prospects for a vaccine. *Expert Rev. Vaccines* **2012**, *11*, 1087–1101.
 32. Rodríguez, M. M.; Bisset, J. A.; Fernández, D. Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from some Latin American countries. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **2007**, *23*, 420–9.
 33. Nam, V. S.; Yen, N. T.; Holynska, M.; Reid, J. W.; Kay, B. H. National progress in dengue vector control in Vietnam: survey for *Mesocyclops* (Copepoda), *Micronecta* (Corixidae), and fish as biological control agents. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2000**, *62*, 5–10.
 34. Kay, B. H.; Nam, V. S.; Tien, T. Van; Yen, N. T.; Phong, T. V.; Diep, V. T. B.; Ninh, T. U.; Bektas, A.; Aaskov, J. G. Control of aedes vectors of dengue in three provinces of Vietnam by use of *Mesocyclops* (Copepoda) and community-based methods validated by entomologic, clinical, and serological surveillance. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2002**, *66*, 40–8.
 35. O'Neill, S. L. The Use of *Wolbachia* by the World Mosquito Program to Interrupt Transmission of *Aedes aegypti* Transmitted Viruses. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2018**, *1062*, 355–360.
 36. Johnson, K. The Impact of *Wolbachia* on Virus Infection in Mosquitoes. *Viruses* **2015**, *7*, 5705–5717.

37. Ramsauer, K.; Schwameis, M.; Firbas, C.; Müllner, M.; Putnak, R. J.; Thomas, S. J.; Desprès, P.; Tauber, E.; Jilma, B.; Tangy, F. Immunogenicity, safety, and tolerability of a recombinant measles-virus-based chikungunya vaccine: a randomised, double-blind, placebo-controlled, active-comparator, first-in-man trial. *Lancet Infect. Dis.* **2015**, *15*, 519–527.
38. Chang, L.-J.; Dowd, K. A.; Mendoza, F. H.; Saunders, J. G.; Sitar, S.; Plummer, S. H.; Yamshchikov, G.; Sarwar, U. N.; Hu, Z.; Enama, M. E.; Bailer, R. T.; Koup, R. A.; Schwartz, R. M.; Akahata, W.; Nabel, G. J.; Mascola, J. R.; Pierson, T. C.; Graham, B. S.; Ledgerwood, J. E.; VRC 311 Study Team Safety and tolerability of chikungunya virus-like particle vaccine in healthy adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet (London, England)* **2014**, *384*, 2046–52.
39. Sourisseau, M.; Schilte, C.; Casartelli, N.; Trouillet, C.; Guivel-Benhassine, F.; Rudnicka, D.; Sol-Foulon, N.; Roux, K. Le; Prevost, M.-C.; Fsihi, H.; Frenkiel, M.-P.; Blanchet, F.; Afonso, P. V.; Ceccaldi, P.-E.; Ozden, S.; Gessain, A.; Schuffenecker, I.; Verhasselt, B.; Zamborlini, A.; Saïb, A.; Rey, F. A.; Arenzana-Seisdedos, F.; Desprès, P.; Michault, A.; Albert, M. L.; Schwartz, O. Characterization of Reemerging Chikungunya Virus. *PLoS Pathog.* **2007**, *3*, e89.
40. Couderc, T.; Lecuit, M. Focus on Chikungunya pathophysiology in human and animal models. *Microbes Infect.* **2009**, *11*, 1197–1205.
41. 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. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1446.
42. Ozden, S.; Huerre, M.; Riviere, J.-P.; Coffey, L. L.; Afonso, P. V.; Mouly, V.; de Monredon, J.; Roger, J.-C.; El Amrani, M.; Yvin, J.-L.; Jaffar, M.-C.; Frenkiel, M.-P.; Sourisseau, M.; Schwartz, O.; Butler-Browne, G.; Desprès, P.; Gessain, A.; Ceccaldi, P.-E. Human Muscle Satellite Cells as Targets of Chikungunya Virus Infection. *PLoS One* **2007**, *2*, e527.
43. Wauquier, N.; Becquart, P.; Nkoghe, D.; Padilla, C.; Ndjoyi-Mbiguino, A.; Leroy, E. M. The Acute Phase of Chikungunya Virus Infection in Humans Is Associated With Strong Innate Immunity and T CD8 Cell Activation. *J. Infect. Dis.* **2011**, *204*, 115–123.

44. Lum, F.-M.; Ng, L. F. P. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. *Antiviral Res.* **2015**, *120*, 165–74.
45. Ng, L. F. P.; Chow, A.; Sun, Y.-J.; Kwek, D. J. C.; Lim, P.-L.; Dimatatac, F.; Ng, L.-C.; Ooi, E.-E.; Choo, K.-H.; Her, Z.; Kourilsky, P.; Leo, Y.-S. IL-1beta, IL-6, and RANTES as biomarkers of Chikungunya severity. *PLoS One* **2009**, *4*, e4261.
46. Kautz, T. F.; Díaz-González, E. E.; Erasmus, J. H.; Malo-García, I. R.; Langsjoen, R. M.; Patterson, E. I.; Auguste, D. I.; Forrester, N. L.; Sanchez-Casas, R. M.; Hernández-Ávila, M.; Alpuche-Aranda, C. M.; Weaver, S. C.; Fernández-Salas, I. Chikungunya Virus as Cause of Febrile Illness Outbreak, Chiapas, Mexico, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 2070–3.
47. Cigarroa-Toledo, N.; Blitvich, B. J.; Cetina-Trejo, R. C.; Talavera-Aguilar, L. G.; Baak-Baak, C. M.; Torres-Chablé, O. M.; Hamid, M.-N.; Friedberg, I.; González-Martinez, P.; Alonzo-Salomon, G.; Rosado-Paredes, E. P.; Rivero-Cárdenas, N.; Reyes-Solis, G. C.; Farfan-Ale, J. A.; Garcia-Rejon, J. E.; Machain-Williams, C. Chikungunya Virus in Febrile Humans and *Aedes aegypti* Mosquitoes, Yucatan, Mexico. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 1804–1807.
48. Garay-Morán, C.; Román-Pedroza, J. F.; López-Martínez, I.; Rodríguez-Martínez, J. C.; Ruiz-Matus, C.; Kuri-Morales, P.; Díaz-Quiñonez, J. A. [Clinical and epidemiological characterization of chikungunya fever in Mexico]. *Rev. Panam. Salud Publica* **2017**, *41*, e58.
49. Danis-Lozano, R.; Díaz-González, E. E.; Trujillo-Murillo, K. D. C.; Caballero-Sosa, S.; Sepúlveda-Delgado, J.; Malo-García, I. R.; Canseco-Ávila, L. M.; Salgado-Corsantes, L. M.; Domínguez-Arrevillaga, S.; Torres-Zapata, R.; Gómez-Cruz, O.; Fernández-Salas, I. Clinical characterization of acute and convalescent illness of confirmed chikungunya cases from Chiapas, S. Mexico: A cross sectional study. *PLoS One* **2017**, *12*, e0186923.
50. Olay-Fuentes, G.; Díaz-Piedra, P.; Hernández-Gómez, R.; Cervantes-Villagrana, R. D.; Presno-Bernal, J. M.; Alcántara-Gómez, L. E. Determinación de intervalos de referencia para química clínica en población mexicana. *Rev Latinoamer Patol Clin* **2013**, *60*, 43–51.
51. Wei Chiam, C.; Fun Chan, Y.; Chai Ong, K.; Thong Wong, K.; Sam, I.-C.

- Neurovirulence comparison of chikungunya virus isolates of the Asian and East/Central/South African genotypes from Malaysia. *J. Gen. Virol.* **2015**, *96*, 3243–3254.
52. Gardner, J.; Anraku, I.; Le, T. T.; Larcher, T.; Major, L.; Roques, P.; Schroder, W. A.; Higgs, S.; Suhrbier, A. Chikungunya virus arthritis in adult wild-type mice. *J. Virol.* **2010**, *84*, 8021–32.
 53. Teo, T.-H.; Her, Z.; Tan, J. J. L.; Lum, F.-M.; Lee, W. W. L.; Chan, Y.-H.; Ong, R.-Y.; Kam, Y.-W.; Leparc-Goffart, I.; Gallian, P.; Rénia, L.; de Lamballerie, X.; Ng, L. F. P. Caribbean and La Réunion Chikungunya Virus Isolates Differ in Their Capacity To Induce Proinflammatory Th1 and NK Cell Responses and Acute Joint Pathology. *J. Virol.* **2015**, *89*, 7955–69.
 54. Langsjoen, R. M.; Haller, S. L.; Roy, C. J.; Vinet-Oliphant, H.; Bergren, N. A.; Erasmus, J. H.; Livengood, J. A.; Powell, T. D.; Weaver, S. C.; Rossi, S. L. Chikungunya Virus Strains Show Lineage-Specific Variations in Virulence and Cross-Protective Ability in Murine and Nonhuman Primate Models. *MBio* **2018**, *9*, e02449-17.
 55. Erasmus, J. H.; Needham, J.; Raychaudhuri, S.; Diamond, M. S.; Beasley, D. W. C.; Morkowski, S.; Salje, H.; Fernandez Salas, I.; Kim, D. Y.; Frolov, I.; Nasar, F.; Weaver, S. C. Utilization of an Eilat Virus-Based Chimera for Serological Detection of Chikungunya Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, e0004119.
 56. Morales-González, K. R.; Zomosa-Signoret, V.; Rivas-Estilla, A. M.; Vidaltamayo, R. *Improving specificity of DENV E proteins through synthetic sequence redesign*;
 57. Seah, C. L.; Chow, V. T.; Chan, Y. C. Semi-nested PCR using NS3 primers for the detection and typing of dengue viruses in clinical serum specimens. *Clin. Diagn. Virol.* **1995**, *4*, 113–20.
 58. Lanciotti, R. S.; Kosoy, O. L.; Laven, J. J.; Velez, J. O.; Lambert, A. J.; Johnson, A. J.; Stanfield, S. M.; Duffy, M. R. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* **2008**, *14*, 1232–1239.
 59. Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A.; Kumar, S. MEGA6:

- Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 2725–9.
60. Kimura, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **1980**, *16*, 111–20.
 61. Tamura, K.; Nei, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* **1993**, *10*, 512–26.
 62. Hasegawa, M.; Kishino, H.; Yano, T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* **1985**, *22*, 160–74.
 63. Drummond, A. J.; Suchard, M. A.; Xie, D.; Rambaut, A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* **2012**, *29*, 1969–73.
 64. Waterhouse, A.; Bertoni, M.; Bienert, S.; Studer, G.; Tauriello, G.; Gumienny, R.; Heer, F. T.; de Beer, T. A. P.; Rempfer, C.; Bordoli, L.; Lepore, R.; Schwede, T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* **2018**.
 65. Voss, J. E.; Vaney, M.-C.; Duquerroy, S.; Vonrhein, C.; Girard-Blanc, C.; Crublet, E.; Thompson, A.; Bricogne, G.; Rey, F. A. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature* **2010**, *468*, 709–12.
 66. Ramos-Castañeda, J.; Sepúlveda-Salinas, K. J.; Mayer, S. V.; Falcón-Lezama, J. A.; Galeana-Hernández, M.; Amaya-Larios, I. Y.; Vasilakis, N.; Comas-García, A.; Martínez-Vega, R. A. Seroprevalence of Neutralizing Antibodies Against Dengue Virus in Two Localities in the State of Morelos, Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2014**, *91*, 1057–1065.
 67. Thompson, A. E.; Anisimowicz, Y.; Miedema, B.; Hogg, W.; Wodchis, W. P.; Aubrey-Bassler, K. The influence of gender and other patient characteristics on health care-seeking behaviour: a QUALICOPC study. *BMC Fam. Pract.* **2016**, *17*, 38.
 68. Rodríguez-Morales, A. J.; Bedoya-Arias, J. E.; Ramírez-Jaramillo, V.; Montoya-Arias, C. P.; Guerrero-Matituy, E. A.; Cárdenas-Giraldo, E. V Using geographic

- information system (GIS) to mapping and assess changes in transmission patterns of chikungunya fever in municipalities of the Coffee-Triangle region of Colombia during 2014-2015 outbreak: Implications for travel advice. *Travel Med. Infect. Dis.* **2016**, *14*, 62–65.
69. Rodriguez-Morales, A. J.; Cárdenas-Giraldo, E. V; Montoya-Arias, C. P.; Guerrero-Matituy, E. A.; Bedoya-Arias, J. E.; Ramírez-Jaramillo, V.; Villamil-Gómez, W. E. Mapping chikungunya fever in municipalities of one coastal department of Colombia (Sucre) using geographic information system (GIS) during 2014 outbreak: Implications for travel advice. *Travel Med. Infect. Dis.* **2015**, *13*, 256–8.
70. Zambrano, L. I.; Sierra, M.; Lara, B.; Rodríguez-Núñez, I.; Medina, M. T.; Lozada-Riascos, C. O.; Rodríguez-Morales, A. J. Estimating and mapping the incidence of dengue and chikungunya in Honduras during 2015 using Geographic Information Systems (GIS). *J. Infect. Public Health* **2017**, *10*, 446–456.
71. Desjardins, M. R.; Whiteman, A.; Casas, I.; Delmelle, E. Space-time clusters and co-occurrence of chikungunya and dengue fever in Colombia from 2015 to 2016. *Acta Trop.* **2018**, *185*, 77–85.
72. Souza, T. M. A.; Azeredo, E. L.; Badolato-Corrêa, J.; Damasco, P. V.; Santos, C.; Petitinga-Paiva, F.; Nunes, P. C. G.; Barbosa, L. S.; Cipitelli, M. C.; Chouin-Carneiro, T.; Faria, N. R. C.; Nogueira, R. M. R.; de Bruycker-Nogueira, F.; dos Santos, F. B. First Report of the East-Central South African Genotype of Chikungunya Virus in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Curr.* **2017**, *9*.
73. Lakshmi, V.; Neeraja, M.; Subbalaxmi, M. V; Parida, M. M.; Dash, P. K.; Santhosh, S. R.; Rao, P. V Clinical features and molecular diagnosis of Chikungunya fever from South India. *Clin Infect Dis* **2008**, *46*, 1436–1442.
74. Anish, T. N.; George, B.; Lawrence, T.; Muthukkutty, S.; Ramachandran, R.; Vijayakumar, K. Clinical Profile of Chikungunya Patients during the Epidemic of 2007 in Kerala, India. *J. Glob. Infect. Dis.* **2011**, *3*, 221.
75. Kularatne, S. A. M.; Gihan, M. C.; Weerasinghe, S. C.; Gunasena, S. Concurrent outbreaks of Chikungunya and Dengue fever in Kandy, Sri Lanka, 2006-07: a comparative analysis of clinical and laboratory features. *Postgrad. Med. J.* **2009**,

- 85, 342–346.
76. Dutta, S. K.; Pal, T.; Saha, B.; Mandal, S.; Tripathi, A. Copy number variation of chikungunya ECSA virus with disease symptoms among Indian patients. *J. Med. Virol.* **2014**, *86*, 1386–1392.
 77. Rowhani-Rahbar, A.; Ellis, E. M.; Feldstein, L. R.; Ellis, B. R.; Halloran, M. E. The First Reported Outbreak of Chikungunya in the U.S. Virgin Islands, 2014–2015. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2016**, *95*, 885–889.
 78. Macpherson, C.; Noël, T.; Fields, P.; Jungkind, D.; Yearwood, K.; Simmons, M.; Widjaja, S.; Mitchell, G.; Noel, D.; Bidaisee, S.; Myers, T. E.; LaBeaud, A. D. Clinical and Serological Insights from the Asian Lineage Chikungunya Outbreak in Grenada, 2014: An Observational Study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2016**, *95*, 890–893.
 79. Suryawanshi, S. D.; Dube, A. H.; Khadse, R. K.; Jalgaonkar, S. V.; Sathe, P. S.; Zavar, S. D.; Holay, M. P. Clinical profile of chikungunya fever in patients in a tertiary care centre in Maharashtra, India. *Indian J. Med. Res.* **2009**, *129*, 438–41.
 80. Keny, M.; Pereira, I.; deSa, S.; Gomes, E. Painful cervical lymphadenopathy: An unusual presentation of chikungunya. *Int. J. Appl. Basic Med. Res.* **2014**, *4*, 47.
 81. Reller, M. E.; Akoroda, U.; Nagahawatte, A.; Devasiri, V.; Kodikaarachchi, W.; Strouse, J. J.; Chua, R.; Hou, Y.; Chow, A.; Sessions, O. M.; Østbye, T.; Gubler, D. J.; Woods, C. W.; Bodinayake, C. Chikungunya as a Cause of Acute Febrile Illness in Southern Sri Lanka. *PLoS One* **2013**, *8*, e82259.
 82. Mattar, S.; Miranda, J.; Pinzon, H.; Tique, V.; Bolaños, A.; Aponte, J.; Arrieta, G.; Gonzalez, M.; Barrios, K.; Contreras, H.; Alvarez, J.; Aleman, A. Outbreak of chikungunya virus in the north caribbean area of colombia: Clinical presentation and phylogenetic analysis. *J. Infect. Dev. Ctries.* **2015**, *9*, 1126–1132.
 83. Norman, F. F.; Monge-Maillo, B.; Perez-Molina, J.-A.; de Ory, F.; Franco, L.; Sánchez-Seco, M.-P.; López-Vélez, R. Lymphadenopathy in Patients with Chikungunya Virus Infection Imported from Hispaniola: Case Reports. *J. Travel Med.* **2015**, *22*, 272–275.
 84. Javelle, E.; Tiong, T. H.; Leparc-Goffart, I.; Savini, H.; Simon, F. Inflammation of the external ear in acute chikungunya infection: Experience from the outbreak

- in Johor Bahru, Malaysia, 2008. *J. Clin. Virol.* **2014**, *59*, 270–3.
85. Sarkar, J. K.; Chatterjee, S. N.; Chakravarti, S. K.; Mitra, A. C. Chikungunya virus infection with haemorrhagic manifestations. *Indian J. Med. Res.* **1965**, *53*, 921–5.
 86. Shah, K. V.; Gibbs, C. J.; Banerjee, G. Virological investigation of the epidemic of haemorrhagic fever in Calcutta: isolation of three strains of Chikungunya virus. *Indian J. Med. Res.* **1964**, *52*, 676–83.
 87. Moyer, N.; Thiberville, S.-D.; Pastorino, B.; Nougairede, A.; Thirion, L.; Mombouli, J.-V.; Dimi, Y.; Leparc-Goffart, I.; Capobianchi, M. R.; Lepfoundzou, A. D.; de Lamballerie, X. First reported chikungunya fever outbreak in the republic of Congo, 2011. *PLoS One* **2014**, *9*, e115938.
 88. Caron, M.; Paupy, C.; Grard, G.; Becquart, P.; Mombo, I.; Nso, B. B. B.; Kassa Kassa, F.; Nkoghe, D.; Leroy, E. M. Recent Introduction and Rapid Dissemination of Chikungunya Virus and Dengue Virus Serotype 2 Associated With Human and Mosquito Coinfections in Gabon, Central Africa. *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *55*, e45–e53.
 89. Kawle, A. P.; Nayak, A. R.; Bhullar, S. S.; Borkar, S. R.; Patankar, S. D.; Daginawala, H. F.; Singh, L. R.; Kashyap, R. S. Seroprevalence and clinical manifestations of chikungunya virus infection in rural areas of Chandrapur, Maharashtra, India. *J. Vector Borne Dis.* **2017**, *54*, 35–43.
 90. Fillingim, R. B.; King, C. D.; Ribeiro-Dasilva, M. C.; Rahim-Williams, B.; Riley, J. L.; III Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings. *J Pain* **2009**, *10*, 447–85.
 91. Schilte, C.; Staikowsky, F.; Staikovsky, F.; Couderc, T.; Madec, Y.; Carpentier, F.; Kassab, S.; Albert, M. L.; Lecuit, M.; Michault, A. Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, e2137.
 92. Chang, A. Y.; Encinales, L.; Porras, A.; Pacheco, N.; Reid, S. P.; Martins, K. A. O.; Pacheco, S.; Bravo, E.; Navarno, M.; Rico Mendoza, A.; Amdur, R.; Kamalpathy, P.; Firestein, G. S.; Bethony, J. M.; Simon, G. L. Frequency of Chronic Joint Pain Following Chikungunya Virus Infection. *Arthritis Rheumatol.*

- 2018**, *70*, 578–584.
93. Zeana, C.; Kelly, P.; Heredia, W.; Cifuentes, A.; Franchin, G.; Purswani, M.; Tieng, A.; Hagmann, S. H. F. Post-chikungunya rheumatic disorders in travelers after return from the Caribbean. *Travel Med. Infect. Dis.* **2016**, *14*, 21–25.
 94. Rodríguez-Morales, A. J.; Calvache-Benavides, C. E.; Giraldo-Gómez, J.; Hurtado-Hurtado, N.; Yepes-Echeverri, M. C.; García-Loaiza, C. J.; Patiño-Barbosa, A. M.; Sabogal-Roman, J. A.; Patiño-Valencia, S.; Hidalgo-Zambrano, D. M.; Vásquez-Serna, H.; Jimenez-Canizales, C. E. Post-chikungunya chronic arthralgia: Results from a retrospective follow-up study of 131 cases in Tolima, Colombia. *Travel Med. Infect. Dis.* **2016**, *14*, 58–59.
 95. Lee, V. J.; Chow, A.; Zheng, X.; Carrasco, L. R.; Cook, A. R.; Lye, D. C.; Ng, L.-C.; Leo, Y.-S. Simple clinical and laboratory predictors of Chikungunya versus dengue infections in adults. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1786.
 96. Win, M. K.; Chow, A.; Dimatatac, F.; Go, C. J.; Leo, Y. S. Chikungunya fever in Singapore: Acute clinical and laboratory features, and factors associated with persistent arthralgia. *J. Clin. Virol.* **2010**, *49*, 111–114.
 97. Nkoghe, D.; Kassa, R. F.; Caron, M.; Grard, G.; Mombo, I.; Bikié, B.; Paupy, C.; Becquart, P.; Bisvigou, U.; Leroy, E. M. Clinical forms of chikungunya in Gabon, 2010. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1517.
 98. Bernard, E.; Solignat, M.; Gay, B.; Chazal, N.; Higgs, S.; Devaux, C.; Briant, L. Endocytosis of Chikungunya Virus into Mammalian Cells: Role of Clathrin and Early Endosomal Compartments. *PLoS One* **2010**, *5*, e11479.
 99. Hoornweg, T. E.; van Duijl-Richter, M. K. S.; Ayala Nuñez, N. V.; Albuлесcu, I. C.; van Hemert, M. J.; Smit, J. M. Dynamics of Chikungunya Virus Cell Entry Unraveled by Single-Virus Tracking in Living Cells. *J. Virol.* **2016**, *90*, 4745–4756.
 100. Wichit, S.; Hamel, R.; Bernard, E.; Talignani, L.; Diop, F.; Ferraris, P.; Liegeois, F.; Ekchariyawat, P.; Luplertlop, N.; Surasombatpattana, P.; Thomas, F.; Merits, A.; Choumet, V.; Roques, P.; Yssel, H.; Briant, L.; Missé, D. Imipramine Inhibits Chikungunya Virus Replication in Human Skin Fibroblasts through Interference with Intracellular Cholesterol Trafficking. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 3145.