

2017

Factores que contribuyen con la susceptibilidad al Chikungunya en León, Nicaragua. 2014 -2015



Lic. Marlen Morales Balmaceda.
Bioanalista Clínico
UNAN - León

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua - León

Facultad de Ciencias Médicas

Departamento de Microbiología y Parasitología

Centro de Enfermedades Infecciosas

**Tesis para optar al título de Master en Ciencias con mención en
Microbiología Médica**



**Factores que contribuyen con la susceptibilidad al Chikungunya en León,
Nicaragua 2014 -2015.**

Autora: Lic. Marlen Patricia Morales Balmaceda.
Bioanalista Clínico.
Estudiante de Maestría
UNAN - León

Tutor: Filemón Bucardo Rivera, PhD
Profesor titular.
Dpto. de Microbiología y Parasitología
Facultad de Ciencias Médicas
UNAN- León

“A la libertad por la Universidad”

León, Nicaragua Noviembre 2017

A mis hermanos, Jorge y Gaby,

por su ejemplo de superación y valioso apoyo.

A mis familiares y amigos especiales que tuvieron

una palabra de aliento a lo largo de este proceso.

Agradecimientos

Agradezco a:

Dios por darme la fortaleza para superar obstáculos y rodearme de personas maravillosas.

Mis padres por enseñarme que la educación y el trabajo constante tienen sus recompensas, este logro es también de ustedes.

Dr. Filemón Bucardo por su esfuerzo y motivación y sus invaluable asesorías científicas. Gracias maestro por inculcar en mí la vocación de la investigación.

MSc. Fredman González los ELISAS no hubieran sido tan fáciles sin tu orientación, MSc. Yaoska Reyes, los PCR no siempre fueron divertidos pero siempre fueron enriquecedores gracias por tu paciencia y al Lic. Omar Zepeda por su apoyo y colaboración constante e incondicional, son lo máximo.

Mis maestros Dr. Vílchez, Dr. Amaya, Dr. Reyes y demás formadores por sus orientaciones y aportes a mi educación como investigadora. Han hecho fácil lo difícil.

Al grupo de investigación de Lennart Svensson de la Universidad de Linköping por su colaboración, sin la cual esto no hubiera sido posible.

Waleska, Vinicio, Clelia y Andrés por sus palabras de ánimo y compañía en innumerables momentos en los que ni yo creía poder terminar, ustedes nunca dudaron. Los quiero con el alma.

Todos los colaboradores del laboratorio de Microbiología y a todos los amigos y personas que estuvieron involucradas directa o indirectamente en la realización y culminación de este trabajo de investigación.

Mis más sinceros agradecimientos.

Marlen Morales

Resumen

Introducción: Chikungunya causa una enfermedad caracterizada por la aparición abrupta de fiebre, artralgia severa incapacitante y rash. Los factores genéticos podrían jugar un rol importante en la progresión de la enfermedad. Estudios recientes sugieren que los antígenos que definen grupos sanguíneos podrían afectar la susceptibilidad a la infección con Chikungunya,

Objetivo: Determinar la asociación entre la enfermedad producida por el virus del Chikungunya y factores genéticos (ABO, Lewis, Secretor, CCR5 Δ 32) y clínicos – epidemiológicos del huésped durante el brote de la enfermedad en la población de León, en el periodo de Octubre 2014 a abril 2016

Diseño: Estudio analítico de casos (145) y controles (145), pareados 1:1 por sexo y edad. Determinación del perfil genético mediante ELISA (ABO, Rh, Lewis y Secretor) y PCR en tiempo real para polimorfismos genético (CCR5 Δ 32)

Resultados: Los factores que mayormente contribuyen con la enfermedad fueron: enfermedades crónicas (OR = 11.3), familiar con Chikungunya (OR = 2.6) y la fumigación de espacios intradomiciliar con una frecuencia de ≥ 4 veces por mes (OR = 2.4) como un factor protector y el reumatismo crónico inflamatorio post-Chikungunya persistió hasta 6 meses en el 28% de los casos y puede persistir en algunos casos hasta 21 meses. No se observaron diferencias significativas entre casos y controles en relación a los factores genéticos como; Tipo sanguíneo, fenotipo Lewis y presencia del antígeno H. La delección en CCR5 Δ 32 tampoco afectó la susceptibilidad a la enfermedad, sin embargo demuestra la circulación de la mutación CCR5 Δ 32 en el 5% del total de casos y controles examinados.

Conclusiones: Este estudio revela que los factores genéticos evaluados (ABO, Lewis, Secretor, CCR5 Δ 32) no son determinantes en la enfermedad producida por el Chikungunya.

Índice

Agradecimientos	iii
Resumen	iv
Abreviaturas.....	vi
1. Introducción	1
2. Antecedentes.....	3
3. Justificación	5
4. Pregunta de Investigación.....	6
5. Hipótesis	7
6. Objetivos	8
6.1 Objetivo General.....	8
6.2 Objetivos Específicos	8
7. Marco Teórico	9
7.1 Historia y Epidemiología	9
7.2 Estructura y Clasificación del virus	11
7.3 Replicación Viral.....	12
7.4 Transmisión.....	17
7.5 Características Clínicas	19
7.6 Patogénesis.....	20
7.7 Respuesta Inmunológica ante la infección.....	22
7.8 Susceptibilidad Genética	24
7.9 Métodos Diagnósticos	32
8. Material y Método	34
9. Resultados.....	41
10. Discusión.....	51
11. Conclusiones	54
12. Recomendaciones	55
13. Referencias	56
14. Apéndices	62

Abreviaturas

IgG	Inmunoglobulina G
IgA	Inmunoglobulina A
ARN	Ácido ribonucleico
HBGA	Antígenos de grupos histo-sanguíneos
LeA	Lewis A
LeB	Lewis B
Le-	Lewis Negativo
SE (+)	Secretor
SE -)	No secretor
ELISA	Ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	PCR con transcriptasa reversa
q- PCR	PCR en tiempo real.
ORF	Marco de lectura abierto
DALY	Años de vida perdidos ajustados a la discapacidad
PRNT	Neutralización por reducción de placas
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAHO	Organización panamericana de la Salud

1. Introducción

El virus del Chikungunya es transmitido por mosquitos y causa una enfermedad caracterizada por la aparición abrupta de fiebre, artralgia severa incapacitante y rash^{1, 2}. El virus fue descubierto en Tanzania, África en 1953, pero estuvo quiescente por muchos años, hasta que incrementó significativamente su frecuencia en el 2004 y se esparció hacia las islas del Océano Indico, la India, el Sureste Asiático, Sur de Europa y finalmente en 2014 alcanzó América^{3, 4}.

Estudios genéticos del virus revelan tres genotipos diferentes, de los cuales, el genotipo Asiático fue introducido en las islas del Caribe después de causar un brote epidémico en Filipinas^{5, 6}.

En 2015 la Organización Panamericana de la salud (PAHO), reportó 693,489 casos sospechosos, 37,480 casos confirmados por laboratorio y 74 muertes en 51 países del Caribe, Sur y Norte de América. Ese mismo año, el Ministerio de Salud de Nicaragua (MINSAL) registro 70,086 casos sospechosos, 5,318 casos confirmados y 1 muerte⁷..

En 2016 los casos sospechosos disminuyeron en un 50% reportándose 351,334 sin embargo hubo 152,769 casos confirmados por laboratorio y 270 muertes. Hasta el 21 de julio de 2017 se habían reportado 60,659 casos sospechosos, 29,032 casos confirmados por laboratorio y 18 muertes; Pese a esta tendencia, la enfermedad por Chikungunya sigue constituyendo una amenaza para América. Además, se estima que cada persona con Chikungunya estará deshabilitada por varios días debido al reumatismo crónico inflamatorio post-Chikungunya^{8,9}

La introducción del virus del Chikungunya causó un brote alarmante puesto que la población era inmunológicamente virgen y las condiciones ambientales del país contribuyeron a la propagación del virus. El virus induce una robusta respuesta inmunológica desarrollando anticuerpos neutralizantes e inmunidad de rebaño a pesar de esta respuesta el virus puede provocar artritis crónica en algunos individuos y en algunos únicamente fiebre o ningún síntoma aparente.¹⁰ La variabilidad de la enfermedad ha sido discutida en muchos estudios y se ha planteado la edad, las

comorbilidades del individuo y el entorno como principales factores.¹¹. Es por eso que se hace necesario el estudio de otros factores que podrían predisponer a la población a desarrollar o no la enfermedad.

Estudios en la India sugieren que los antígenos que definen grupos sanguíneos podrían afectar la susceptibilidad a la infección con Chikungunya, sin embargo, los resultados no son concluyentes ¹²⁻¹⁴.

En Nicaragua la proporción de LeB, LeA y Le- es de 71%, 25% y 4% respectivamente, y según estudios están estrechamente relacionados con la infección por algunos virus como Norovirus y Rotavirus ^{15, 16}.

El Gen CCR5 es un receptor quimiotáctico que permite el establecimiento de vías para atraer células fagocíticas e inflamatorias al lugar de la infección.¹⁷ La mutación de este consiste en la delección de 32 pares de bases, y es conocido como CCR5 Δ 32, no funcional¹⁸. Se conoce por estudios anteriores que existe asociación entre CCR5 Δ 32 y otros arborvirus como el virus del Nilo Occidental, el virus de la encefalitis por garrapatas y Dengue sea socia mayormente con la severidad de la enfermedad. ¹⁹⁻²¹

Mediante un estudio de casos y controles se pretende contribuir a la comprensión de la enfermedad del Chikungunya en Nicaragua, en particular el rol que podrían jugarlos antígenos histo-sanguíneos (ABO, Lewis, Secretor) y la frecuencia alélica de la mutación CCR5 Δ 32 con el desarrollo de la enfermedad por el virus del Chikungunya durante el brote de la enfermedad en la población de León.

2. Antecedentes

En los últimos años se ha observado un incremento significativo en la infección por Chikungunya luego de haber permanecido quiescente por 51 años en Asia y África, expandiéndose desde las islas del Océano Indico hasta América^{73, 4}.

La introducción en América, una población susceptible, ha provocado un incremento exagerado de casos, debido probablemente a la falta de una memoria inmunológica contra este virus, la circulación de vectores, clima apropiado para el vector y migración de personas.

Chikungunya ha sido estudiado en modelos animales para comprender su patogénesis y tratamiento clínico como el estudio elaborado por Broeckel y col., en el 2015, quienes utilizaron primates no humanos (NHP) y demostraron que la infección con Chikungunya provoca una alta producción de interferón tipo I, desarrollo de LB y LT (CD+ Y CD8+) Chikungunya-específicos. También revelaron infección multi-orgánica persistente en los NHP, recolectando virus infeccioso del bazo, hígado y músculo hasta los 44 días post infección, lo que sugiere la cronicidad de la enfermedad en los humanos²².

Estudios en Nicaragua han planteado que la seroprevalencia es significativamente mayor en individuos mayores de 15 años y además han identificado que factores como la edad, disponibilidad de agua, tamaño de la vivienda y estatus socioeconómico están asociados con la presencia de individuos con anticuerpos neutralizantes anti - Chikungunya. ¹¹

Varios estudios han tratado de establecer relaciones causales entre factores del hospedero y susceptibilidad a la infección, por ejemplo, Kumar y col., en el 2010, en la India, reportaron que los individuos con grupo sanguíneo A, AB y Rh positivos tienen mayor probabilidad de infectarse con Chikungunya¹². Similarmente, Lokireddy y col., en el 2009, también en la India, sugirieron que los tipo O y Rh positivos eran más susceptibles a la enfermedad del Chikungunya que los otros grupos sanguíneos y que los individuos Rh negativo eran más resistentes ¹⁴.

La mutación CCR5 Δ 32 tiene origen en Europa posiblemente en Escandinavia y se cree que migro a otras poblaciones por invasiones de los Vikingos durante los siglos VIII al X, la mayor distribución alélica de esta variante se encuentran actualmente en dichas poblaciones, donde la frecuencia alélica es de alrededor del 10% ²³

En estudios realizados en países Latinoamericanos como Colombia han descrito que la mutación CCR5 Δ 32 es poco frecuente y la frecuencia alélica se puede encontrar entre 2.2% y 6.2% ²⁴⁻²⁶. Similarmente en México la frecuencia alélica reportada fue de 4.4%, en Ecuador encontraron 0.5% y en Venezuela no se ha encontrado dicha mutación. ²⁷. En Brazil una población más heterogénea, en cuanto a sus descendientes, han reportado una variabilidad en las frecuencias alélicas de 0 -10.1%.²⁸. Es importante mencionar que los estudios previamente descritos representan grupos poblacionales limitados. En Nicaragua, se encontró que la frecuencia alélica de dicha mutación representa aproximadamente el 3% en una muestra poblacional de Chinandega.²⁹

Existen muchos estudios en los cuales se ha asociado esta mutación con la susceptibilidad a las infecciones con algunos virus, por ejemplo las personas que acarrean dicha mutación en CCR5 son resistentes a la inmunodeficiencia adquirida por el virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) ³⁰. En contraste, las personas con dicha mutación desarrollan formas severas durante la infección con algunos arbovirus como el virus de la encefalitis por garrapatas (TBE) ¹⁹, virus del Nilo Occidental (WNV)²⁰ y el virus del Dengue (DENV-2)²¹. En la literatura revisada, hasta el momento de impresión, no se encontraron referencias donde se describa la mutación en CCR5 y su asociación con Chikungunya.

3. Justificación

La infección por Chikungunya es un problema quiescente, que se ha convertido en una creciente preocupación de salud pública.

El perfil clínico y epidemiológico de la enfermedad producida por Chikungunya ha sido objeto de investigación por diversos grupos desde su descubrimiento. Además, se conoce con cierta precisión el proceso de replicación y patogénesis viral, así como, algunos aspectos de la inmunidad.

Para complementar la historia natural de la enfermedades necesario investigar el rol de los factores del hospedero, en particular aquellos que pudieran expresar susceptibilidad.^{3, 4, 12, 14.}

Este estudio contribuirá a la comprensión del rol que juegan los factores genéticos (ABO, Lewis, Secretor, CCR5 Δ 32) y clínicos – epidemiológicos del hospedero en la susceptibilidad a la enfermedad producida por Chikungunya.

4. Pregunta de Investigación

¿Existe alguna relación entre factores genéticos (ABO, Lewis, Secretor, CCR5Δ32) y clínicos – epidemiológicos del hospedero con el desarrollo de la enfermedad por el virus del Chikungunya?

5. Hipótesis

Los factores genéticos (ABO, Lewis, Secretor, CCR5 Δ 32) y/o clínicos – epidemiológicos en las personas que desarrollan la enfermedad de Chikungunya son significativamente diferentes que en personas asintomáticas.

6. Objetivos

6.1 Objetivo General

Determinar la asociación entre la enfermedad producida por el Chikungunya y factores genéticos (ABO, Lewis, Secretor, CCR5 Δ 32) y clínicos – epidemiológicos del hospedero durante el brote de la enfermedad en la población de León, en el periodo de Octubre 2014 a abril 2016.

6.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar clínicamente y epidemiológicamente una muestra poblacional de personas que desarrollaron la enfermedad por Chikungunya.
- Determinar la distribución de antígenos de grupos histo- sanguíneos;(ABO, Lewis y Secretor), y la frecuencia alélica de la mutación CCR5 Δ 32.
- Establecer el nivel de asociación entre la enfermedad por Chikungunya y los factores genéticos (ABO, Lewis, Secretor, CCR5 Δ 32) y/o clínicos – epidemiológicos del hospedero.

7. Marco Teórico

7.1 Historia y Epidemiología

El virus del Chikungunya fue descubierto en 1953 en una epidemia en el este de África específicamente en Tanzania. Chikungunya es a una palabra Makonde que significa “aquel que se encorva” refiriéndose a la postura que adquieren el individuo infectado producto del dolor severo de las articulaciones ^{3, 4}. Desde la primera identificación de infección del virus Chikungunya en humanos, los brotes de Chikungunya han ocurrido a lo largo de los países africanos y asiáticos en los cuales miles se han enfermado. Los intervalos de re-emergencia son impredecibles y en estos dos últimos continentes han aparecido en intervalos de 7 -20 años ³¹

Después de un desfase de 20 años, 24 diferentes brotes probables de Chikungunya fueron reportados entre 2001 y 2003 solo en Asia, con más de 8,068 casos en 29 ciudades de 9 provincias ³². En junio de 2004 se reportó un brote en Kenia, siguiéndole otro en las Islas del Océano Indico en los primeros meses del 2005. En Comoros, más 5,000 casos fueron reportados de junio a marzo 2005³³. Unos meses después, el virus ya estaba en tierras de Mayotte con 4,308 casos, Seychelles con más de 1,000 casos, Mauritius con más de 200 casos, y la isla de La Reunión, la cual reportó 12,400 casos de Chikungunya entre diciembre del 2005 y los primeros dos meses del 2006 con un increíble incremento de casos de hasta 186,000 y 96 muertes por Chikungunya y que luego se aumentó a 236,000 casos (más de un tercio de la población) y 181 muertes. También afectó la India con un estimado de 1.5– 6.5 millones de casos ³⁴.

En 2007 fue reportado por primera vez un brote en Europa en el noreste de Italia, en el cual hubo alrededor de 97 casos, confirmando que es plausible la transmisión de brotes a través del mosquito *Aedes albopictus* en Europa. En diciembre del 2013, Francia reportó dos casos autóctonos confirmados por laboratorio en la parte Francesa de las Islas Caribeñas de San Martin desde entonces se ha esparcido en 51 países y territorios de la región de las Américas de la Organización Mundial de la Salud (OMS)⁹.

La epidemia del Chikungunya en América está establecida y comparte el carácter explosivo de las epidemias causadas por este virus en otras regiones, donde las tasas de ataque pueden alcanzar hasta el 40%³⁷.

La carga de la enfermedad del virus del Chikungunya en Latinoamérica es una inquietud emergente, recientes estimaciones indican que aproximadamente 1,783 personas desarrollarán reumatismo crónico inflamatorio post-Chikungunya en Nicaragua, lo cual podría tener un impacto en la salud pública nacional, además se estima que el impacto de Chikungunya en Latinoamérica es el doble del observado por dengue en el 2004, lo cual sugiere que Chikungunya podría convertirse en la primera arbovirosis de la región. Estudios recientes han reportado que la carga mínima de la enfermedad en Nicaragua es 627 años de vida perdidos ajustados a la discapacidad (DALYs) y la carga máxima estimada fue de 698 DALYs relacionado al desarrollo de inflamación post- Chikungunya reumática crónica ⁸

7.2 Estructura y Clasificación del virus

El Chikungunya pertenece al género *Alfavirus* de la familia *Togaviridae*, es un virus pequeño, (60-70nm de diámetro), está constituido por una sola hebra de ARN de sentido positivo, protegido por una cápside icosaédrica de 70 nm de diámetro, cubierta por una envoltura que contiene proteínas en forma de espículas con un genoma de 12,000 nucleótidos³⁸.

El virus del Chikungunya tiene dos marcos de lectura (ORF) uno de 7,424 nucleótidos y otro de 3,732 nucleótidos. El primer ORF en el extremo 5' codifica para dos poliproteínas, que son las precursoras de las proteínas no estructurales (NSP1-4). El segundo ORF en el extremo 3' codifica las proteínas estructurales decápside, glicoproteínas de envoltura 1 y 2 y dos pequeños polipéptidos de función desconocida (C, E1, E2, E3, 6K respectivamente)³⁹.

La región no traducible de unión entre los dos ORF, se ha reportado que contiene un promotor para la transcripción del ARNm sub-genómico, al igual que en otros alfavirus como Sindbis virus³⁸. Ver Fig. 2

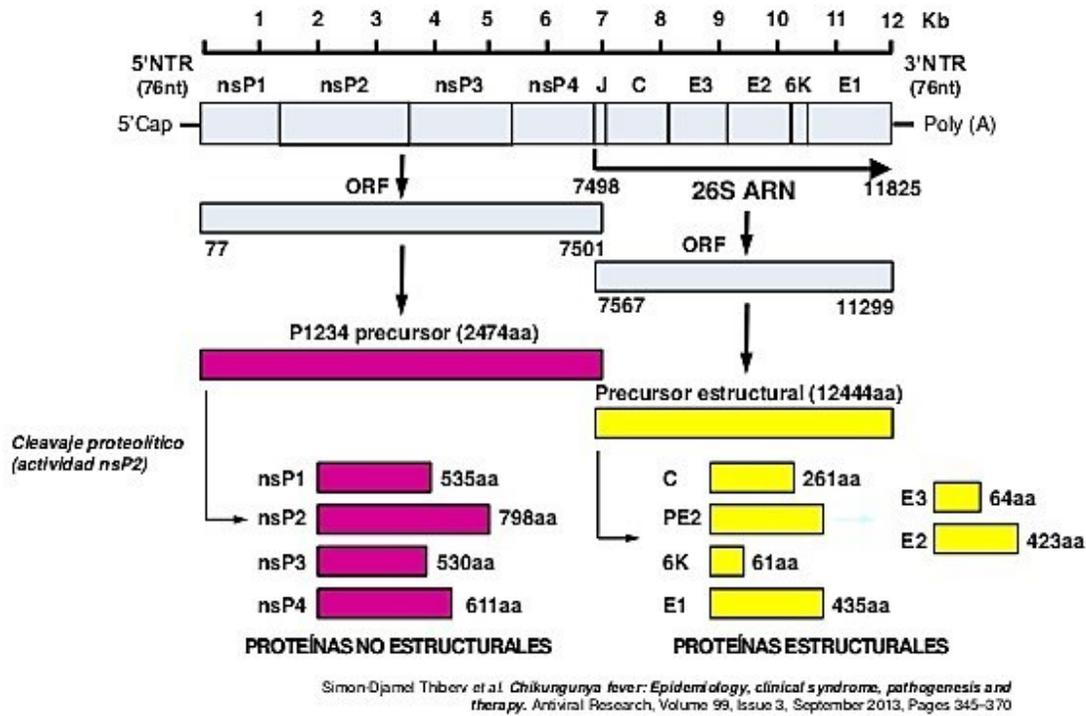


Fig.2 Organización del Genoma de Chikungunya y sus productos genómicos. Las secuencias proximales 5' y 3' de Chikungunya cargan unas regiones no traducibles (NTR). La región de unión (J) es también no codificante. La hebra sub-genómica positiva ARNm referida como 26S ARN es transcrita de una hebra negativa intermedia y sirve como ARNm para la síntesis de proteínas estructurales virales. Las diferentes proteína no estructurales (nsP1-nsP4) y proteínas estructurales (c, cápside; E1, E2, E3, envoltura; 6k) son generados después del clivaje proteolíticos de los precursores poliproteínicos. {Thiberville, 2013 #171}

7.3 Replicación Viral

El proceso de replicación del Chikungunya no se conoce con exactitud, pero recientes estudios muestran avances relevantes³⁹. Estos estudios sugieren que la glicoproteína **E2** es el ligando que reconoce el receptor celular y permite la entrada del virus a la célula, mientras que la glicoproteína **E1** contiene el péptido de fusión vesicular que permite la liberación de la cápside^{40, 41}. También se ha propuesto como receptor celular a la lectina DC-SIGN, la cual es receptor del arbovirus Sindbis que también pertenece a los alfavirus⁴².

La replicación ocurre en el citoplasma, tanto en las células de los vertebrados como en los insectos, en asociación directa con el aparato de Golgi. El virus entra a la célula por endocitosis mediada por receptores, la cual es dependiente de clatrina, colesterol y acidificación del endosoma^{40, 43, 44}.

En los mosquitos se sugiere como receptor a moléculas similares al receptor de Laminin. Seguido de la endocitosis, el ambiente ácido del endosoma provoca cambios conformacionales en la envoltura que expone al péptido E1, que media la fusión de membranas entre el virus y la célula del huésped permitiendo la liberación de la cápside viral en el citoplasma, la cual pierde estabilidad por su interacción con la fracción pesada de los ribosomas. Dos precursores de las proteínas no estructurales (nsPs), son traducidos del ARNm viral, y el clivaje de estos precursores genera nsP1 – nsP4. La proteína nsP1 está dirigida a la síntesis de ARN viral de sentido negativo y tiene propiedades de capping, la nsP2 tiene dos dominios de actividad helicasa y proteínasa, y también está implicada en el apagado de la transcripción de la célula huésped, la nsP3 es parte de la unidad de replicasa y la nsP4 es la ARN polimerasa viral. Estas proteínas conforman el complejo de replicación viral, que sintetizan una hebra completa negativa de ARN intermediario, sirviendo como hebra molde para la síntesis de ARN genómico (49S), y subgenómico (26S). El Subgenómico dirige la expresión de los precursores poliproteínicos C-pE2-6K-E1 que son procesados por una serina proteasa autoproteolítica. La cápside (C), se libera, y las glicoproteínas de pE2 y E1son generadas por un procesamiento posterior asociado al aparato de Golgi y exportadas a la membrana plasmática donde se escinden de pE2 a E2, esta última está implicada en la unión al receptor celular, y E3, que media el plegamiento apropiado de pE2 y su posterior asociación con E1⁴⁵.

Los epítopes en la glicoproteína E2 son reconocidos por anticuerpos neutralizantes y por esta razón E2 es el candidato para la vacuna ⁴⁶. El ensamblaje viral se promueve por la unión de la nucleocápside viral y el reclutamiento de las glicoproteínas de la envoltura asociadas a la membrana. La nueva partícula, saldrá de la célula por gemación, facilitada por la acción proteolítica de furina celular sobre el complejo E2:E3⁴⁷. Ver Fig 3

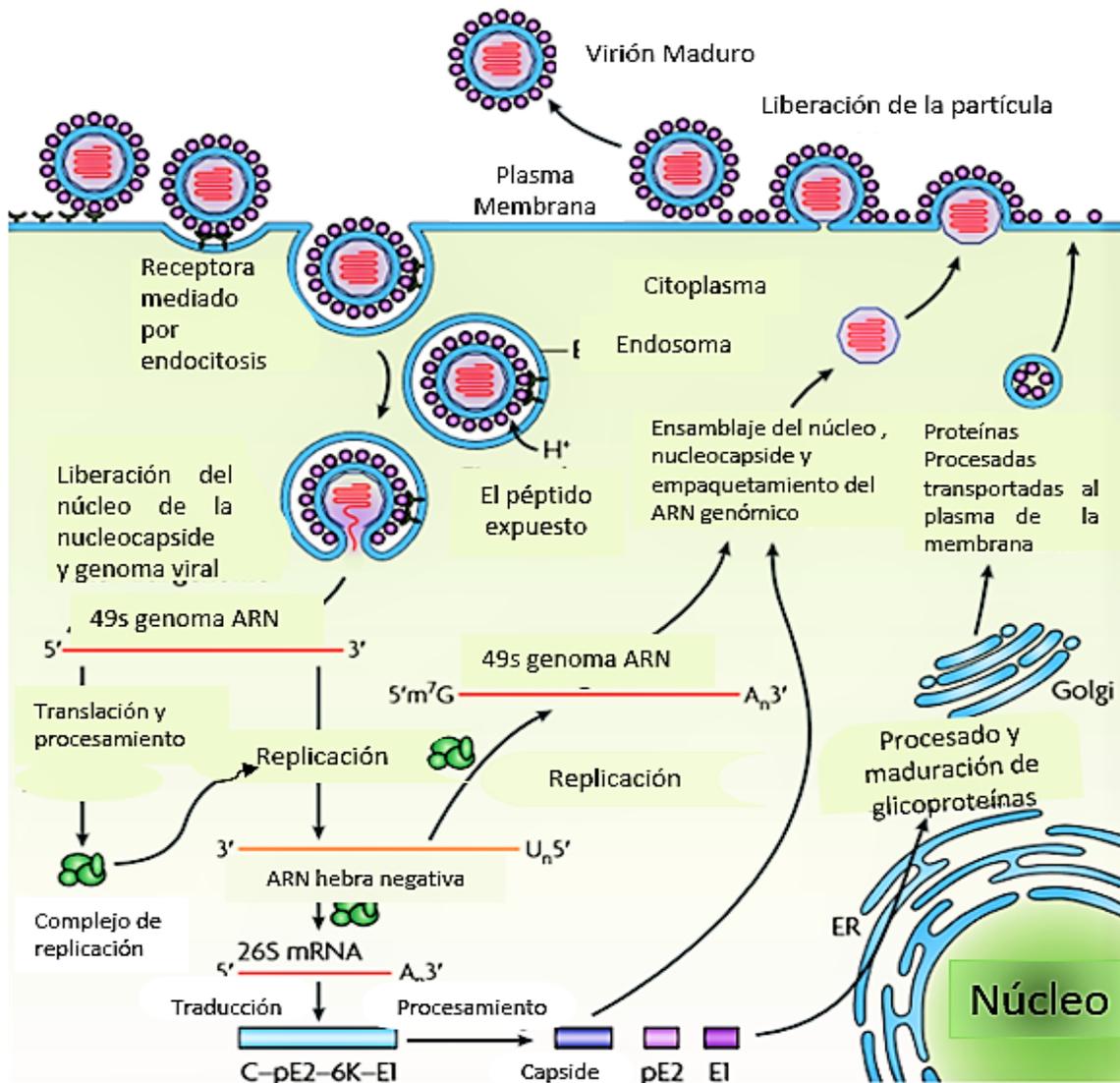


Fig.3 Ciclo de replicación viral del Chikungunya. Representación esquemática.⁴⁸

7.3.1 Análisis Filogenético

Los análisis filogenéticos indican la circulación de tres genotipos: Oeste África, (WA) Este, Centro y Sur África (ECSA) y Asiático (A), pero análisis serológicos sugieren un solo serotipo ⁴⁹.

El genotipo ECSA ha sido asociado con brotes epidémicos en las Islas del Océano Índico. Los análisis genéticos del ECSA, causante del brote epidémico en la isla Reunión mostraron que una mutación en el gen E1, sustitución de alanina por valina (A226V), facilitó la adaptación del virus a un nuevo vector (*A. Albopictus*). Dicha mutación no afectó la interacción del virus con *A. aegypti* y su habilidad de infectar al huésped humano y que junto con otras mutaciones M269V y D284E, han demostrado ser características de las cepas del océano Índico ⁵⁰.

En contraste, los análisis genómicos del Chikungunya introducido en las islas del Caribe indican alta homología con el genotipo Asiático, en particular con Chikungunya circulando en Indonesia 2007, China 2012 y Filipinas 2013 ⁶. Ver Fig.4

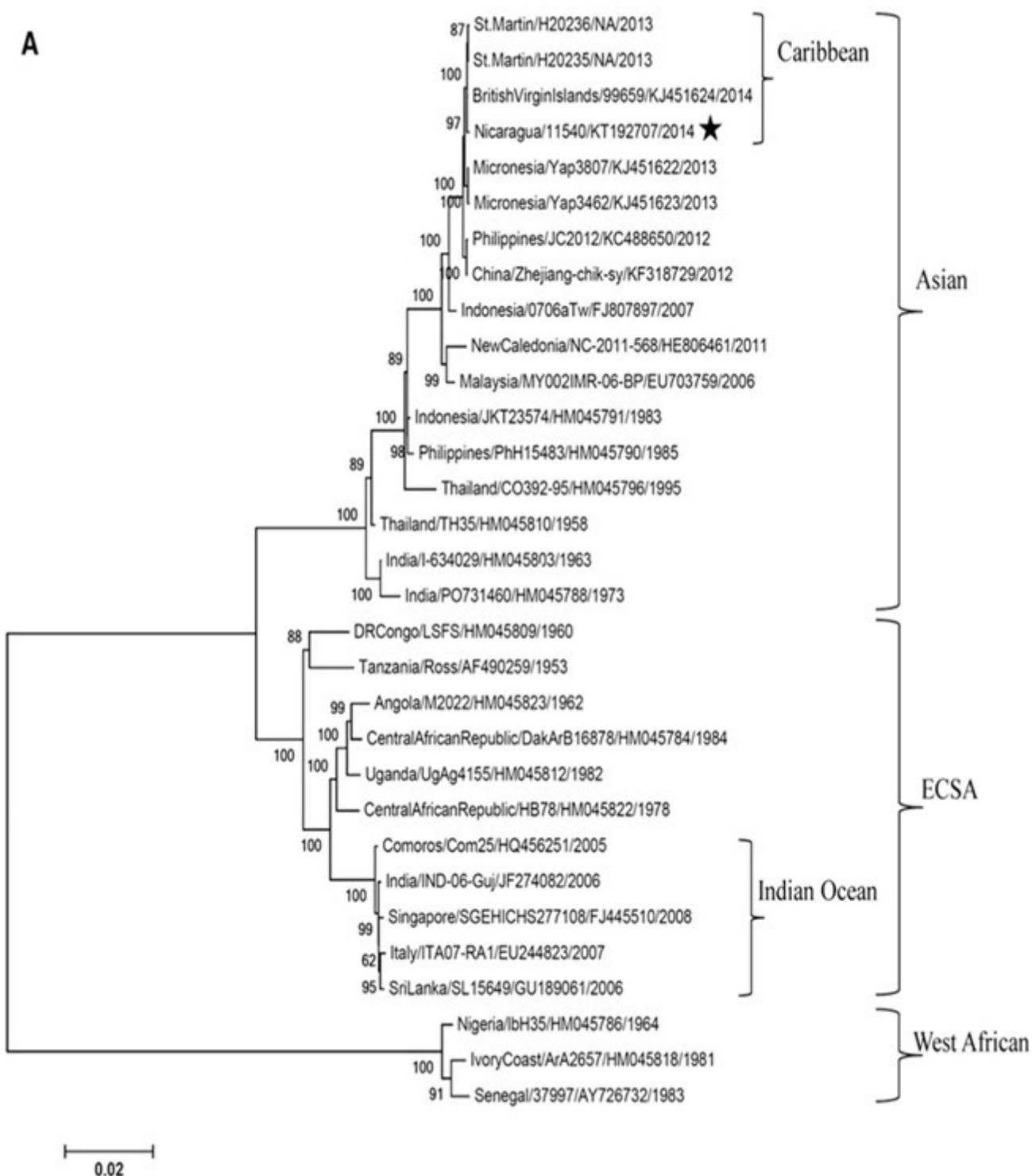


Fig.4 Análisis filogenético de Chikungunya. El virus del Chikungunya de Nicaragua pertenece al clado del Caribe del Genotipo Asiático. En la figura podemos observar los 3 Genotipos ⁵¹

7.4 Transmisión

El Chikungunya es una arbovirosis transmitida por mosquitos principalmente *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Los humanos sirven como reservorios durante los periodos epidémicos mientras que en los periodos inter epidémicos muchos reservorios animales han sido incriminados entre ellos los monos, roedores y aves.⁵²

Existen dos ciclos de transmisión:

Selvático: En África Chikungunya se había mantenido típicamente en un ciclo selvático involucrando primates no humanos y roedores como reservorios así como mosquitos que viven en el bosque, e.g. *Aedes africanus*, *Aedes cordellieri*, *Aedes furcifer-taylori* y *Aedes luteocephalus*, como vectores mientras que el famoso *Aedes aegypti* no está involucrado en este ciclo ^{49, 52, 53}.

Las características del ciclo de transmisión silvestre son una periodicidad de circulación con intervalos de silencio que duran aproximadamente tres años⁵⁴. Esto debido al ciclo en los monos, ellos son el reservorio común para el virus y después de un ciclo todos los monos quedan inmunizados hasta que otro grupo de monos susceptibles surge, es decir otra generación de monos.

Urbano: Se cree que inicialmente el esparcimiento se dio debido a la infección de la población cercana de humanos que habitaban o trabajaban en las zonas aledañas a los bosques selváticos ⁵². Seguido de un transporte a los centros urbanos, poblado de vectores endémicos como *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Adicionalmente se esparce más por los viajeros aéreos infectados, que típicamente viajan en el periodo de incubación asintomático entre 1-4 día ⁵⁵.

En el brote actual, *Aedes* ha sido el mosquito involucrado ⁵⁶. Este es diurno, con una preferencia por picar al atardecer. Este mide de 8 -10mm de largo. Es casi imposible identificar al *Aedes aegypti* del *Aedes albopictus* con solo la observación sin embargo se sabe que *Ae. albopictus* es más activo y de preferencia extra domiciliar en cambio *Ae. aegypti* se alimenta y descansa dentro del domicilio ⁵⁷ Ver Fig. 5

Mientras que el *Ae. aegypti* es considerado el vector clásico, desde la epidemia en La Reunión la especie *Ae. albopictus* es considerado biológicamente más adaptado: vive de 4 a 8 semanas, vuela distancia relativamente más largas (aproximadamente un radio de 400-600m), sus huevos son más resistentes a la desecación y sobrevive a la estación seca. Investigaciones genéricas del Chikungunya revelan que la mutación de E1, una proteína de fusión de clase II, resultó en el cambio de un residuo de alanina por uno de valina en la posición 226, que facilita la entrada viral, a pH bajo y regula la dependencia del colesterol durante el proceso de fusión del virus con la célula del hospedero. Consecuentemente la mutación incrementa la infectividad viral del *Aedes albopictus* haciendo a este último un excelente vector para la transmisión del Chikungunya a los humanos⁵⁸.

La transmisión a través de exposición sanguínea infectada ya ha sido documentada, sugiriendo que Chikungunya puede ocurrir a través de transfusiones sanguíneas⁵⁹.

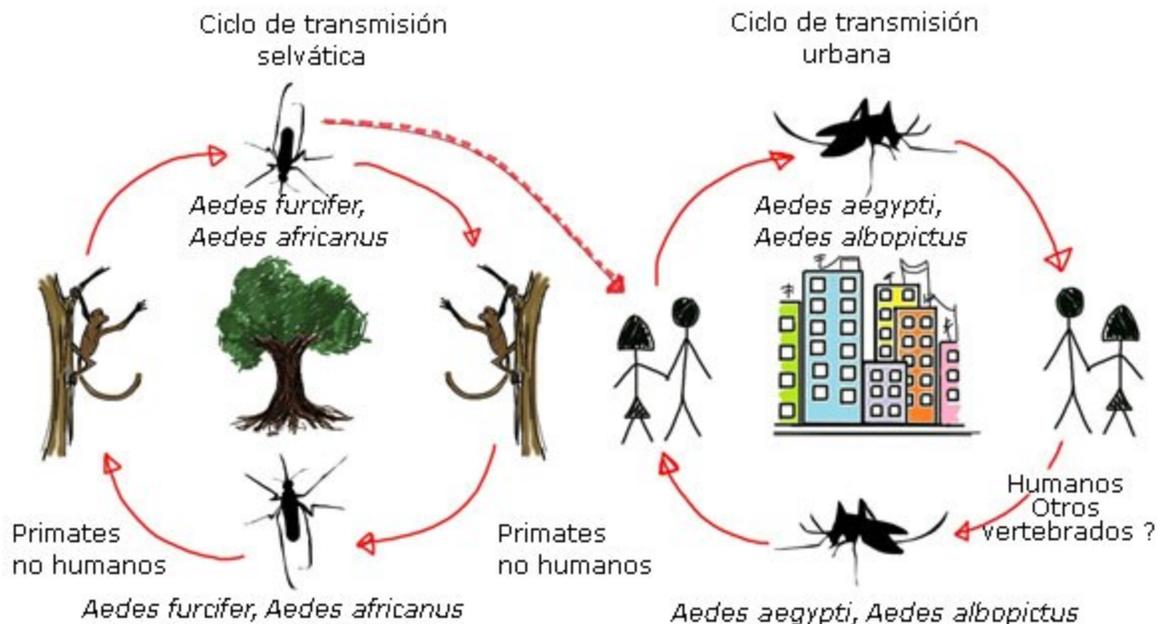


Fig.5 Ciclos de transmisión selváticos y urbanos de Chikungunya. En esta imagen se demuestra los distintos vectores y vertebrados del huésped.

7.5 Características Clínicas

Los alfavirus se dividen clínicamente en dos subgrupos: Virus encefalogénicos, que afectan las neuronas, como es el caso del virus de la encefalitis equina Venezolana y artritogénicos que básicamente está asociado con poliartritis y rash^{1, 60} aunque se han observado algunos casos de complicaciones serias causando meningoencefalitis, meningitis e incluso Síndrome de Guillen – Barré ⁶¹.

El periodo de incubación de la enfermedad del Chikungunya es de aproximadamente 3-7 días (rango: de 1- 12 días) tras la picadura de un mosquito. Sin embargo, no todos los individuos desarrollan los síntomas, aproximadamente del 3% - 25% de las personas con anticuerpos para Chikungunya tienen infecciones asintomáticas¹. Luego es seguido por la aparición abrupta de fiebre, artralgia severa incapacitante y rash². El rash aparece generalmente en el tronco del cuerpo, palmas de la mano o en las extremidades, generalmente de forma maculopapular. Los dolores generalmente son bilaterales, simétricos y son más comunes en muñecas, codos, dedos, rodillas y tobillos. Las artralgias de las extremidades inferiores pueden ser gravemente incapacitantes resultando en disminución de la velocidad de la marcha y paso vacilante. Aunque el virus es eliminado por la respuesta inmunológica, el dolor en las articulaciones es recurrente, puede durar meses o años e incluso desarrollar artritis ⁶². Otros síntomas adicionales que pueden ocurrir durante la fase aguda de la enfermedad son: dolor de cabeza, fatiga, náusea, vómito y menos común conjuntivitis. Es posible observar anomalías en pruebas sanguíneas como leucopenia, trombocitopenia, hipocalcemia y un incremento en las pruebas de funcionamiento hepático sin embargo, no son específicas y no ocurren suficientemente frecuente como para ser parte del diagnóstico ⁶³.

La enfermedad severa por Chikungunya puede ocurrir en cualquier grupo de edad. Los niños \leq 6 meses de edad pueden presentar lesiones vesiculares extensivas en la piel (epidermolisis bullosa), las cuales pueden cubrir hasta el 35% de la superficie corporal⁶⁴. Las manifestaciones hemorrágicas como epistaxis, sangrado de encías y púrpura pueden observarse en 10% de los pacientes pediátricos ⁶⁵. En adultos la enfermedad severa se asocia con enfermedades concomitantes como: diabetes,

hepatopatía alcohólica, epilepsia, cardiopatía, hipertensión e insuficiencia renal. La severidad también puede manifestarse como encefalopatía y encefalitis, además, con desórdenes vasculares y respiratorios, así como falla renal, hepatitis y miocarditis⁶⁶.

7.6 Patogénesis

El proceso patogénico empieza con la picadura del mosquito hembra infectado con Chikungunya introduciendo de esta manera los viriones a nivel intradérmico y éstos entran en los capilares subcutáneos, replicándose en las células susceptibles como fibroblastos, células endoteliales y macrófagos. Estudios de biopsias de tejido muscular de pacientes infectados con Chikungunya han mostrado antígenos virales en el interior de mioblastos, exclusivamente ⁶⁷. Además, se observó crecimiento viral y efectos citopáticos en cultivos de células satélites.

Estudios en ratones de laboratorio han confirmado que los fibroblastos (piel y articulaciones) y mioblastos (células progenitoras del músculo esquelético) soportan la replicación, además, las células epiteliales y endoteliales de algunos órganos como hígado, bazo y cerebro⁶⁸. Los cultivos celulares derivados de fibroblastos, células epiteliales, hepatocitos y melanoma corroboran el tropismo del Chikungunya por tejidos ⁶⁹.

Además, se ha observado que el virus también puede replicarse en células endoteliales, pero las células del sistema inmune (linfocitos, monocitos, DC y NK) son no-permisivas. Después de la replicación inicial, el virus alcanza los nódulos linfáticos y posteriormente produce la viremia ($10^9 - 10^{12}$ virus/ml) que facilita la infección de tejidos u órganos secundarios como hígado y fibroblastos de las articulaciones⁴⁸. Se ha encontrado ARN de Chikungunya y proteínas virales en el tejido sinovial durante la artralgia severa y persistente^{67, 70}.

Se sabe que los alfavirus afectan la maquinaria de la célula, inhibiendo los niveles óptimos de transcripción celular y translación; y secuestrando la maquinaria celular del huésped para la replicación del genoma y síntesis de proteínas. En las células del huésped, el Chikungunya se replica a una rápida velocidad e induce efectos

citopáticos. Chikungunya induce apoptosis en las células Hela y en los fibroblastos primarios. La habilidad de inducir apoptosis depende de la replicación viral. ³⁸ Ver Fig. 6

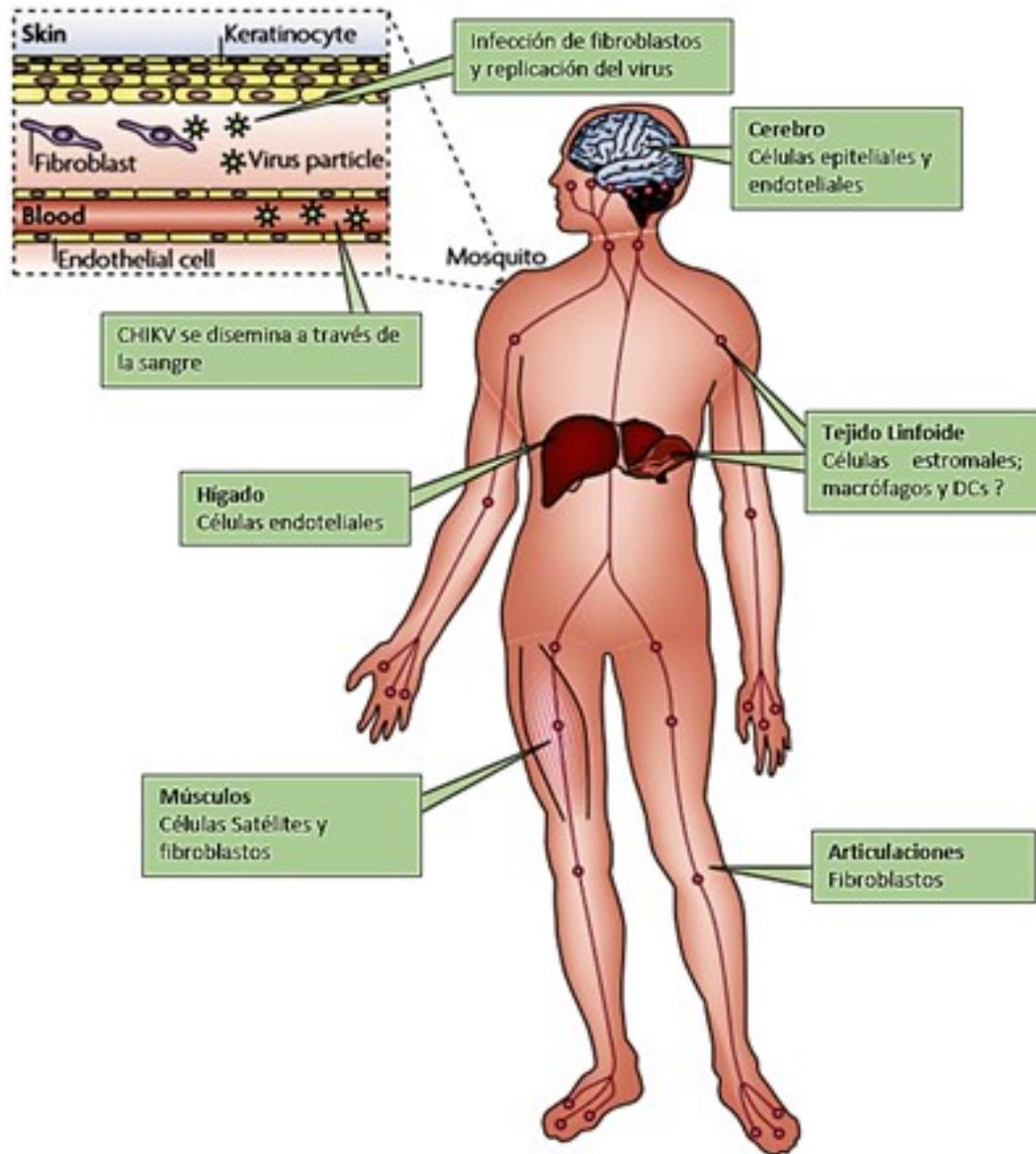


Fig.6 Diseminación del virus del Chikungunya en los vertebrados. La transmisión ocurre después del piquete de un mosquito, se replica en la epidermis, fibroblastos, se disemina a hígado, músculo, articulaciones y tejidos linfático. Las células diana están indicadas por cada tejido. ⁴⁸.

7.7 Respuesta Inmunológica ante la infección

7.7.1 Respuesta Innata

La presencia del ARN viral dentro de los fibroblastos probablemente induce la síntesis de Interferón tipo I (α y β) y citocinas proinflamatorias ⁷¹, dependientes de la interacción con receptores tipo Toll (RIG-I y MDA-5). Los receptores tipo Toll comprenden 11 proteínas transmembrana, 6 de las cuales (TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 Y TLR9), son reconocidas por actuar en la inmunidad antiviral. Como Chikungunya tiene un ARN que se replica con ADNds como intermediario, los potenciales sensores incluyen TLR3, TLR7, TLR8 y RLRs (receptores tipo RIG, que se encuentran en el citoplasma y que incluyen a ARN helicasas como MDA5, también conocido como IFIH1). Esta producción IFN I por los fibroblastos infectados es regulada por CARDIF (CARD es un adaptador que induce IFN β ; también conocido como MAVS) que actúa regulando MDA5 y RIG-I ⁷².

La protección puede también estar mediada por la diferenciación mieloide de la proteína de respuesta primaria 88 (MyD88), que es una proteína adaptadora para varios TLRs y para la interleucina-1 β . Existen dos posibles vías para el control de la infección de Chikungunya vía MYD88, la hematopoyética, que en Chik es pobremente estimulada y la segunda que se relaciona con su papel como adaptador para los receptores IL-1 β y IL-18 ⁷³. Además, se ha sugerido que el estado antiviral y anti-inflamatorio induce apoptosis.

El aclaramiento viral de la sangre durante la infección con Chikungunya evidencia una potente y suficiente repuesta antiviral, probablemente de origen innato ⁴⁸. En pacientes infectados con Chikungunya se ha observado incremento de INF γ e IL12, ambas promotoras de la activación celular en la repuesta inmune innata. En contraste, citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias son pobremente expresadas o expresadas en pocos pacientes durante la fase aguda, respectivamente ⁶⁹.

En base a los datos de otros alfavirus (SINV y SFV), se cree que es posible que Chikungunya haya desarrollado mecanismos para modular tanto la inducción de IFN de tipo I y las moléculas efectoras estimuladas por IFN de tipo I de las vías de

señalización, por lo tanto un candidato para esta modulación inmune es la proteína no estructural 2 (de nsP2), que actúa como un inhibidor de la síntesis de proteínas del huésped.⁷⁴

7.7.2 Respuesta Adaptativa

La comprensión de la respuesta inmune humoral (mediada por anticuerpos), y celular es importante para el desarrollo de vacunas, así como también para el entendimiento de los dolores crónicos experimentados por alrededor del 30 – 40% de los individuos afectados por el Chikungunya.⁴⁸

Anticuerpos naturales anti-Chikungunya de isotipos IgM e IgG han sido detectados en pacientes en diferentes etapas de la infección, generalmente la IgM es detectable 2 o 3 días después de la aparición de los síntomas y persiste por varias semanas e incluso hasta un año después de la resolución de la enfermedad. La IgG anti-Chikungunya aparece poco después de la infección (10-13 días después) y persiste en títulos altos por años⁷⁵.

A través de una rápida y fuerte seroconversión, la infección por Chikungunya aparentemente provoca una inmunidad protectora de larga duración. Estos anticuerpos anti - Chikungunya son capaces de proveer protección temprana y controlar su diseminación a través de anticuerpos neutralizantes y la activación del sistema del complemento⁷⁶.

Estudios en plasma humano obtenidos en diferentes momentos después de la infección muestran que la región N-terminal de la glicoproteína E2 provoca una respuesta de anticuerpos anti-Chikungunya de larga duración, también el reconocimiento de anticuerpos de E2 cambia a lo largo del curso de la infección según estudios experimentales realizados en macacos infectados. Esto sugiere que la inducción diferencial de anticuerpos neutralizantes contra epítopes de células B expuestos o escondidos podría contribuir a la aclaración medida por anticuerpos durante todo el curso de la enfermedad⁷⁷.

Muy prontamente después la infección las frecuencias y valores absolutos de las células T son encontrados significativamente más bajos en los pacientes infectados con Chikungunya que en los donantes sanos. Y que luego de un periodo de dos meses el conteo de células T regresa a sus niveles normales⁷⁸. Una significativa fracción de células T periféricas restante son activadas y expresan en su superficie el receptor de la muerte CD95, y se cree que la sobre estimulación de las células T y el CD95 dependiente de la apoptosis de las células CD4+podría ser la explicación de la linfopenia temprana⁷⁹.

Algunos estudios sugieren que durante la fase crónica de la enfermedad las respuesta de las células T son mayormente lideradas por los CD8+, infiltrados de CD4+ y CD8+ han sido encontrados en articulaciones inflamadas de modelos de ratón⁸⁰, sin embargo, otros estudios en animales sugieren que CD4+es el que tiene mayor rol en la mediación de la severidad de la inflamación en las articulaciones⁸¹.

7.8 Susceptibilidad Genética

Los factores genéticos son importantes en la predisposición a varias enfermedades. Las enfermedades complejas son generalmente influenciadas por más de un gen o por factores ambientales y como consecuencia, no exhiben un modo simple de herencia. Algunos individuos muestran variaciones en la susceptibilidad y/o resistencia a ciertas enfermedades. Por lo tanto la susceptibilidad del hospedero, factores genéticos y posibles factores ambientales pueden resultar de gran valor en cuanto al desarrollo de enfermedades como la fiebre por Chikungunya. ¹⁴

7.8.1 Sistema ABO

El sistema de grupo sanguíneo ABO, descubierto hace más de 100 años por Karl Landsteiner, es uno de los sistemas más importantes en medicina transfusional. Está compuesto por los antígenos A, los antígenos B, y los correspondientes anticuerpos contra estos antígeno; éste y el grupo sanguíneo Rhesus son los más importantes. La expresión genética de los antígenos ABO es controlada por 3 genes. El gen H, ubicado en el cromosoma 19, codifica para la producción de una enzima transferasa (transferasa H), que une una molécula de L-fucosa a la galactosa terminal (Gal) de un

precursor común (sustancia precursora) unido a los lípidos o proteínas de membrana del eritrocito, dando lugar al antígeno H, el cual es el paso anterior en la formación de los antígenos de los grupos sanguíneos⁸². Ver Fig. 7.

Clínicamente en la práctica de las transfusiones sanguíneas estos antígenos han sido ampliamente investigados en: estudios de población, genéticos, antropológicos y de susceptibilidad a enfermedades incluyendo dengue y hepatitis C. Además el grupo sanguíneo ABO ha mostrado un rol importante en la resistencia y / o susceptibilidad a infecciones; estudios bien diseñados destinados a definir la relación entre fenotipos de grupos sanguíneos ABO, frecuencia de alelos y susceptibilidad a la infección por Chikungunya son limitados, como los recientes estudios realizados en India, que sugieren que los antígenos que definen los grupos sanguíneos podrían afectar la susceptibilidad a la infección con Chikungunya, sin embargo, los datos no son concluyentes ¹²⁻¹⁴.

7.8.2 Expresión de Factores Antigénicos

A. FUT 2

El antígeno soluble ABH puede ser sintetizado y secretado por las células de los tejidos. Por lo tanto las sustancias de grupos sanguíneos específicas pueden ser encontradas en todas las secreciones del cuerpo y su presencia es dependiente de los genes heredados ABO, así como también por los genes secretores que regulan su formación. Aproximadamente 78% de la población aleatoria en Estados Unidos ha heredado el gen Se, por lo tanto poseen el genotipo SeSe o Sese. Este genotipo se llama secretor (FUT2). Los antígenos secretados A, B, y/o H son glicoproteínas expuestas en la superficie de los glóbulos rojos. Los individuos pueden ser no secretores (sese) o secretores (SeSe/Sese). El gen secretor codifica para la producción de α -2-L-fucosyltransferasa, que es expresada en tejidos de secreciones exocrinas⁸³.

B. FUT 3

El sistema de grupo sanguíneo Lewis es único, estos antígenos no son sintetizados por los glóbulos rojos y tampoco incorporados en las membranas de éstos, sino que son antígenos manufacturados por tejidos celulares y secretados en los fluidos corporales. Estos antígenos son absorbidos por las membranas de los eritrocitos a través de un mecanismo desconocido desde el plasma pero no forman parte de la estructura de la membrana ⁸³.

En la saliva las sustancias con especificidad Lewis son glicoproteínas solubles, mientras que en el plasma son glicoesfingolípidos. Los principales antígenos de este sistema son Lewis A (Le^a) y Lewis B (Le^b).

El gen Lewis no codifica para la producción de antígeno Lewis, sino que produce una glicosiltransferasa específica y L-fucosiltransferasa. Esta enzima agrega L-fucosa a la sustancia precursora básica. Ver Fig.7

La expresión del antígeno H es regulada por la enzima H especialmente las membranas eritrocitarias y en células endoteliales vasculares, mientras que la enzima del gen secretor regula la expresión del antígeno H, principalmente a nivel del tracto gastrointestinal, células epiteliales y en los fluidos corporales como la saliva ⁸⁴.

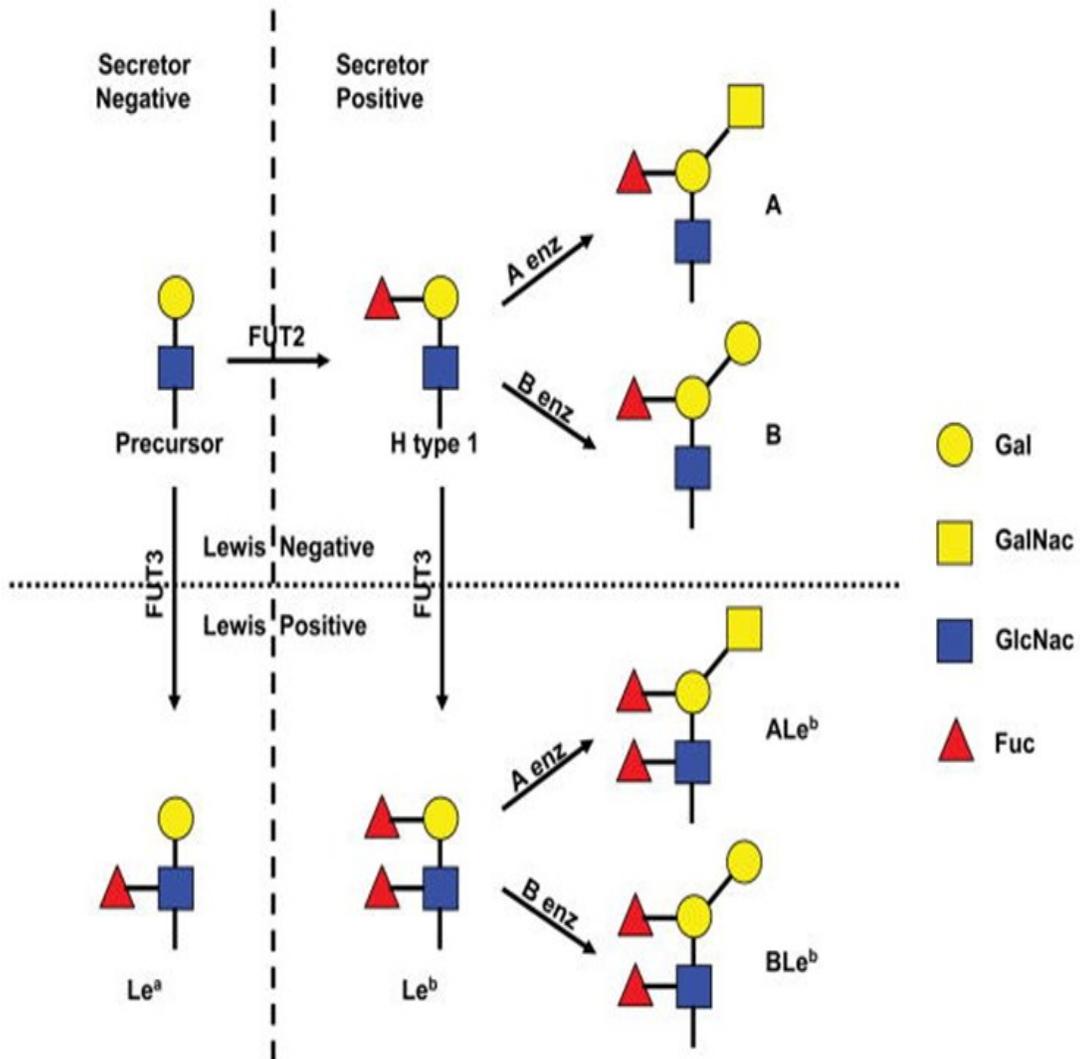


Fig.7 Vía de síntesis de antígenos de grupo sanguíneo ABO y Lewis. El precursor es modificado por fucosiltransferasa-2 (FUT2), para producir el glicano tipo H1, que puede ser modificado adicionalmente por FUT3 (para producir Lewis-B [Le^b]) y por las enzimas A y B (enz), para producir los antígenos A y B de grupos histo-sanguíneos. Si FUT2 no es funcional, la persona es no secretor, aunque el precursor tipo H1 todavía puede ser modificado para producir Lewis-A (Le^a), en presencia de un FUT3 funcional. Las personas con una enzima FUT2 funcional se llaman secretor positivo porque los antígenos histo-sanguíneos ABH se encuentran en las secreciones y en las superficies mucosas.⁸⁵

Estos antígenos que definen fenotipos sanguíneos ya han demostrado asociación con la susceptibilidad a la infección con otros virus ^{15, 16}. En estudios previos sobre factores genéticos (Grupo sanguíneo ABO y Lewis) , de la población del pacífico Nicaragüense, se ha revelado que el tipo sanguíneo más común es O (66%) seguido por A (20%) y B (10%) y en menos proporción AB (4%)^{15, 16}El antígeno de Lewis está presente en el 75% de la población investigada y se distribuye en Le^b (71%), y Le^a (4%), el 25% son Lewis-negativos (Le⁻). El alto porcentaje de Le⁻, es interesante pues dicho fenotipo es poco común en muchas de las poblaciones estudiadas, con excepción de las Africanas. El 94% de la población es secretor, es decir, sintetiza el antígeno H1 y solamente el 6% es no-secretor, este dato contrasta con el 25% de no-secretor encontrado en Caucásicos Europeos y Norteamericanos⁸⁶.

Los antígenos que definen grupos sanguíneos; incluyendo el ABO, Rh, Secretor y Lewis, son sistemas complejos y altamente dependientes de la etnicidad. La observación que la infección con Chikungunya estuvo por aproximadamente 20 años limitado a regiones de África, Océano Índico y Asia, sugiere una posible asociación entre virus y etnicidad. Además, los virus de Chikungunya que circulan en cada una de esas regiones son genéticamente diferentes.

7.8.3 CCR5

Durante los procesos inflamatorios se ven involucrados lípidos (prostaglandinas, leucotrienos y tromboxano), aminoácidos modificados (histamina y serotonina) y pequeñas proteínas (factores de crecimiento, interleucinas y quimiocinas). Las quimiocinas son proteínas de bajo peso molecular (8.000 Da) que se asocian a las respuestas inflamatorias. Los neutrófilos, basófilos, monocitos y linfocitos T que expresan distintos receptores y pueden ser activados por quimiocinas específicas. Estas tienen actividad quimiotáctica que permite el establecimiento de vías para atraer células fagocíticas e inflamatorias al lugar de la infección, son estas interacciones entre receptores y células específicas las que permiten y determinan la naturaleza de la respuesta inmunitaria. ⁸⁷

Familia	Expresión celular	Receptor
CXCL	Neutrófilo	CXCR1, CXCR2
	Macrofaos	: CXCR4
	Linfocito T en reposo	CXCR4
	Linfocito T activado	CXCR3
	Linfocito B	CXCR3, CXCR4
	C. dendrítica	CXCR4
	Célula NK	CXCR3
CCL	Linfocito T activado	CCR1, CCR2, CCR4, CCR5 , CCR7
	Linfocito B	CCR4, CCR5 , CCR6, CCR7
	Macrofagos	CCR1, CCR2, CCR5 , CCR8
	C. dendrítica	CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6
	Célula NK	CCR2, CCR5
	Eosinófilo	CCR1, CCR3
	Basófilo	CCR2, CCR3
CX3CL	Linfocito T activado, linfocitos B, monocitos y células NK	CX3CR1

Cuadro 1. Clasificación de quimiocinas de acuerdo a familia y receptores respectivos.

Las quimiocinas muestran gran redundancia en la utilización de sus receptores; de esta manera, varias quimiocinas pueden acoplarse a un mismo receptor y una quimiocina puede ligarse a varios receptores. Por otro lado, los leucocitos, principalmente activados, expresan múltiples receptores debido a la modulación por factores tanto exógenos como endógenos, permitiendo así que en una misma célula la activación de sus receptores por quimiocinas diferentes produzca señales intracelulares distintas.⁸⁸

Los receptores son importantes para el anclaje a la célula, la activación del receptor y por consiguiente la señalización intracelular de citocinas inflamatorias. El receptor de quimiocinas CC5 (CCR5) pertenece a la familia de receptores de transmembrana de siete dominios acoplados a proteínas G (GPCR), que regula la circulación y las funciones efectoras de los linfocitos T de memoria/ efectora, macrófagos y células dendríticas inmaduras y es específico para citocinas quimiotácticas CCL3, 4 y 5.

Como muchos GPCR, CCR5 es regulado por agonistas – dependientes de procesos que involucran receptores quinasa acoplados a proteínas G (GRK) - dependiente de fosforilación, desensibilización e internalización mediada por β - arrestina.¹⁷

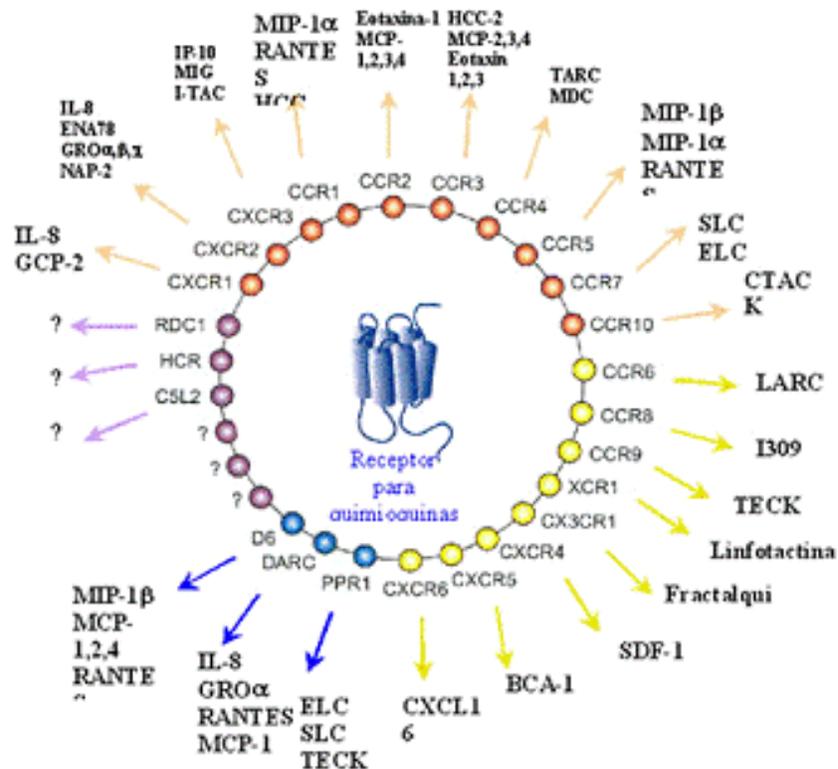


Fig.8 Receptores de quimiocinas. La interacción de las quimiocinas con sus receptores se caracteriza porque la mayor parte de los receptores interactúan con múltiples ligandos y la mayor parte de los ligandos interactúan con más de un receptor.⁸⁸

La delección de 32 pares de bases (CCR5 Δ 32) en el gen CCR5 elimina la funcionalidad de dicho receptor. Esta mutación se encuentra principalmente en individuos de Europa y del Sudeste Asiático, donde la frecuencia alélica es de ~0.1 un promedio del 10% a diferencia del Sur de Europa donde la frecuencia es de 0.08 (8%)²³. Existen variaciones dependiendo del área geográfica.¹⁸

Los individuos homocigotos a la mutación CCR5 Δ 32 parecen ser más susceptibles para algunas infecciones. Estudios sobre la función de dicha mutación en ratones de laboratorio muestran que los individuos que carecen de un gen CCR5 funcional tienen una respuesta inmune limitada a varias infecciones por diferentes patógenos.⁸⁹ Específicamente, se ha demostrado que esta mutación juega un papel muy importante en la resistencia e infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Los portadores heterocigotos de CCR5 Δ 32 tienen una susceptibilidad reducida a la infección con VIH y una progresión lenta al síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA). En tanto, los homocigotos son resistentes a la infección con VIH, debido a la carencia de dicho co-receptor funcional (CCR5) necesario para la entrada del virus en las células T CD4+.⁹⁰

También se ha observado asociación en algunos arbovirus, como el virus de la encefalitis por garrapata (TBE) y la mutación del CCR5 Δ 32 como factor de riesgo en el desarrollo de TBE severa, encontrándose que la prevalencia de homocigotos en los pacientes que desarrollan TBE severa es mayor que en los controles.¹⁹ En el caso del virus del West Nile (WNV) estudios, en modelos de ratón, han reportado que el receptor CCR5 es un factor antiviral determinante de sobrevivencia en ratones infectados con WNV, ya que CCR5 actúa regulando el tráfico de leucocitos al cerebro infectado.²⁰

Estudios de Dengue, en modelos de ratón, sugieren que existe un menor riesgo o consecuencias severas en los ratones con CCR5 Δ 32 infectadas con DENV – 2.²¹ Por otro lado en estudios realizados, en pacientes con Dengue del Departamento de Chinandega, Nicaragua, sugieren que es posible que el gen CCR5 Δ 32 esté relacionado con el desarrollo de Dengue con signos de alarma, pero debido a que la población estudiada fue muy pequeña y la rara prevalencia del alelo CCR5 Δ 32, fue muy difícil mostrar evidencia significativa entre el gen CCR5 y la severidad de la infección por dengue²⁹.

7.9 Métodos Diagnósticos

El diagnóstico de la infección por Chikungunya es basado en síntomas clínicos y pruebas de laboratorio. Este último depende altamente de la calidad, volumen y tiempo de la muestra obtenida durante el curso de la enfermedad y es el diagnóstico definitivo ante la sospecha clínica de Chikungunya. Los síntomas suelen durar aproximadamente 5 días durante los cuales la viremia está presente y puede ser confirmada por cultivo y aislamiento del virus, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y las pruebas de detección de antígeno. Los anticuerpos específicos antiChikungunya se vuelven detectables alrededor del día 5 de fiebre y persisten por 3 a 6 meses⁹¹. En cambio los antígenos IgG aparecen hasta el día 10-14. Los 3 tipos principales de pruebas son; Aislamiento viral, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) y serología⁹²

7.10.1 Aislamiento viral y cultivo celular

El aislamiento del Chikungunya puede llevarse a cabo fácilmente por inoculación intracerebral de los ratones y la inoculación de mosquitos. El virus puede ser recuperado de suero, plasma, sangre total y de tejidos recolectados de autopsias. La inoculación en mosquitos es el método de aislamiento más sensible pero es impráctico para el diagnóstico de rutina debido a los requerimientos especializados y los costos de mantenimiento. El cultivo celular es ampliamente usado, con preferencia en células de mosquito C6/36 (clonadas de *A. albopictus*), o AP61 (clonadas de *A. pseudoscutellaris*). Otras opciones de líneas celulares menos sensitivas incluyen células de BHK-21, células HeLa y Vero, que producen efectos citopáticos con una sensibilidad comparable a métodos in vivo. Dichos efectos citopáticos deben ser confirmados por sueros anti-Chikungunya específicos⁹³.

7.10.2 Métodos Moleculares

Las técnicas de detección de ácido nucleico viral pueden ser realizadas en fase aguda y ofrecen una mejor sensibilidad en menor tiempo. La detección específica de Chikungunya se puede realizar usando una combinación de amplificación de PCR en tiempo real (q-PCR) y PCR anidada del fragmento del gen E-2. Sin embargo el

método más utilizado recientemente es RT-PCR en tiempo real. Todos estos métodos tienen 3 pasos básicos: extracción de ARN viral, amplificación, detección y caracterización de los productos amplificados. Se pueden utilizar una gran cantidad de especímenes como sangre, suero, plasma, saliva y tejidos frescos o preparados con formalina⁹³. Varios protocolos se han planteado en búsqueda de diferentes genes de Chikungunya como: Gen de envoltura E1 ⁹⁴ y Gen de proteína no estructural nsP1 ⁹⁵.

7.10.3 Métodos Serológicos

Para el diagnóstico serológico, se utiliza suero obtenido de sangre total. Existen varios métodos, se puede hacer mediante la demostración de anticuerpos IgM o mediante la demostración de anticuerpos IgM/ IgG específicos para Chikungunya, utilizando técnicas de ELISA de captura (MAC-ELISA), cuya sensibilidad y especificidad es del 93% y 95 % respectivamente. Hasta el año 2010, no habían ELISAs IgM comerciales disponibles validados por la OMS, hoy en día existe una variedad de Kits comerciales para IgM e IgG disponibles. También se puede realizar el diagnóstico por neutralización por reducción de placas (PRNT), en la cual se demuestra su positividad si el aumento de los títulos de PRNT es de 4 veces más entre la muestra aguda y la convalescente. Los ensayos de MAC –ELISA son confirmados también por PRNT debido a reacciones cruzadas con otros alfavirus⁹³.

8. Material y Método

Tipo de Estudio: Estudio de casos y controles.

Periodo del estudio: Octubre 2014 – Abril 2016.

Población de Estudio: Fueron personas de todas las edades y de ambos sexos, que tuvieron Chikungunya, estudiados de manera retrospectiva de la ciudad de León y personas que asistieron al laboratorio de Microbiología de la UNAN – León que cumplían con la definición de casos. Así mismo personas sanas de todas las edades y de ambos sexos.

Muestra de estudio: Un total de 290 Muestras.

Muestreo: Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia, el cálculo de la muestra se realizó utilizando la calculadora epidemiológica de OpenEpi ⁹⁶ con un nivel de confianza del 95% y 80% de poder. En este estudio se incluyeron casos confirmados de Chikungunya que ocurrieron entre Octubre del 2014 y Abril del 2016. Cada caso fue pareado en una proporción 1:1 por sexo y edad.

Definición de caso: Todos aquellas personas de diferentes edades y sexo de la ciudad de León, que padecieron de fiebre con artralgia de aparición abrupta y rash (poliartralgia, fiebre y rash), tenían un PCR positivo para Chikungunya o presentaron IgG anti-Chikungunya en fase convalescente.

Definición de control: Toda persona que no había padecido síntomas clínicos característicos de Chikungunya (poliartralgia, fiebre y rash), en los 6 meses previos a la toma de muestra y tenían la misma edad (+/- 2 años) y sexo.

Criterios de inclusión para casos

Se incluyeron todas aquellas personas que cumplían con la definición de caso y habían asistido a alguna unidad de salud del Departamento de León entre octubre 2014 y diciembre 2015 o se presentó al laboratorio de Microbiología de la UNAN-León entre

enero - abril 2016y que clínicamente (poliartralgia, fiebre y rash) fueron diagnosticadas con Chikungunya.

Criterios de exclusión para casos

Se excluyeron todas las personas que aunque cumplían con la definición de caso, rechazaron participar en el estudio, no se encontraron en sus viviendas al momento de la visita o cambiaron de domicilio. También se excluyeron casos que al momento de la visita tenían otras enfermedades infecciosas.

Criterios de inclusión para controles:

Se incluyeron todas las personas que cumplían con la definición de control.

Criterios de exclusión para controles:

Se excluyeron todas las personas que aunque cumplían con la definición de controles, rechazaron participar en el estudio.

Recolección de la información y toma de muestras

Recolección de la información: Cada caso sospechoso se le solicitó, ya sea en su casa o en el laboratorio de Microbiología su participación en el estudio y firma de un consentimiento informado. Una enfermera colaboradora del estudio le explicó los objetivos de la investigación y le entregó el consentimiento para su lectura. Se realizó una entrevista para solicitar información clínica y epidemiológica de interés. En caso de ser un menor (≤ 16 años), se le hizo la entrevista al padre o tutor del menor. Posteriormente, se preguntó si habían personas de la misma edad (± 2 años) y de igual sexo que el caso en el domicilio, que deseará participar en el estudio y que no hubiera tenido síntomas característicos de Chikungunya, para incluirlo como controles. En caso contrario, se buscó el control en el vecindario. En el caso de los que fueron tomados en el laboratorio de Microbiología se buscó en la población asistente al mismo. Cada control también fue entrevistado para obtener información acerca de su estado de salud e información epidemiológica. Ver apéndice N° 1 y 2

Obtención y conservación de la muestra: Luego de que la persona aceptó participar y llenó la ficha se procedió a la obtención de una muestra de sangre y una de saliva. Si era un adulto: Se tomó 3ml de muestra sanguínea del antebrazo en un tubo Vacutainer con EDTA y alrededor de 2ml de saliva en un frasco de boca ancha. Si era un bebé se tomó 1-2ml de muestra sanguínea en un tubo Vacutainer con EDTA, para la muestra de saliva, en el caso de los bebés o de niños que no pudieran escupir, las muestras fueron recolectadas haciendo uso de un hisopo se tomó la muestra de saliva rotándolo y se colocó en un vial con PBS (500µL).

Las muestras fueron debidamente rotuladas y trasladadas al Laboratorio de Microbiología de la UNAN-León en termos con refrigerantes para mantener una temperatura entre 4-8 °C hasta el momento del análisis; una vez en el laboratorio, las muestras sanguíneas fueron centrifugadas a 3,000 rpm por 5 minutos para obtener el plasma; ambas muestras (plasma y saliva), se transfirieron a crioviales para ser guardadas a -20 °C hasta ser analizadas.

Análisis de Laboratorio

Determinación del tipo sanguíneo:

Se procedió a determinar el tipo sanguíneo mediante el método de hemaglutinación en lámina, utilizando el kit comercial de Cypress Diagnostics. Se colocaron 3 gotas de sangre en la lámina y se mezclaron con anticuerpos anti-A, anti-B y anti-D, respectivamente. La aglutinación franca con algún anticuerpo dado indicaba la presencia del antígeno.

Determinación de anticuerpos IgG anti – Chikungunya:

Se utilizó un Kit comercial de ELISA de la casa Euroimmune AG 23560 (Luebeck - Germany). Se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, se colocó 100 µL de suero diluido 1:101 en cada pozo y se incubó por 60 minutos a 37°C. Posteriormente se lavó 3 veces con solución de lavado (10X), diluida con agua destilada en una proporción de 1/10, seguidamente se agregó 100 µL de conjugado (peroxidasa de rábano marcada con anti-human IgG), se incubó por 30 minutos a

temperatura ambiente. Después se lavó 3 veces con la solución antes preparada, se colocó el sustrato de TMB y a continuación se incubó por 15 minutos. La reacción enzimática se detuvo con 100 μ L de ácido sulfúrico, 0.5 M. Finalmente se obtuvo lecturas de absorbancias a 450 nm con un filtro diferencial de 630nm.

Se calculó el ratio (muestra/ calibrador 2) y se interpretó de la siguiente manera:

Ratio < 0.8: Negativo

Ratio < 1.1 Indeterminado

Ratio \geq 1.1 Positivo

Determinación de fenotipo Lewis y Secretor en saliva:

Se hizo de acuerdo a los procedimientos descrito por Nordgren y col.¹⁶

Fenotipo Lewis: Se sensibilizaron las placas de ELISA (NUNC 96F Maxisorp; Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Denmark) con saliva, diluida 1:500 en buffer carbonato (0.1 M buffer carbonato–bicarbonato, pH 9.6), la placa fue incubada a 4°C en cámara húmeda durante la noche. Al día siguiente se lavó 4 veces la placa con PBS – Tween20 al 0.05%, se agregó 100 μ L de anticuerpo anti-lewis A (α -Lewis A seraclone Cypress Diagnosis), diluido 1:5000 con PBS y se incubó por 90 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo se lavó 4 veces con PBS – Tween20 al 0.05%, luego se agregó 100 μ L de conjugado anti-lewis (Goat anti-horse MTC BIORR) diluido 1:1000 con PBS y se incubó durante 90 minutos a 37°C. Seguidamente se lavó nuevamente 4 veces e inmediatamente después se agregó 100 μ L del sustrato de TMB y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente en cámara oscura. Una vez terminado el tiempo, se detuvo la reacción enzimática con ácido sulfúrico 2N. Finalmente se obtuvieron las lecturas de absorbancias a una longitud de onda de 450nm con un filtro diferencial de 630nm. Fueron consideradas Lewis A, si la densidad óptica \geq 0.100. En cada placa se usaron saliva Lewis A, Lewis B y Lewis-Negativo como controles y además PBS para controlar el fondo. El procedimiento aquí descrito fue utilizado para determinar Lewis B, con la excepción que se utilizó el monoclonal anti-Lewis B (α -Lewis B seraclone Cypress Diagnosis).

Fenotipo Secretor: Las placas de ELISA se sensibilizaron con 100µl de saliva diluida 1:500 en PBS y se incubó a 4°C durante la noche, en cámara húmeda. Al día siguiente se lavó dos veces con PBS-Tween20 al 0.05% y se bloqueó con PBS-BSA al 3% durante 60 minutos a 37°C, en cámara húmeda. Transcurrido el tiempo se lavó 2 veces con PBS-Tween20 al 0.5%, se agregó 100µl de lectinperoxidasa SIGMA-28146-IMG diluido 1:400 con PBS y se incubó durante 90 minutos a 37°C. Posteriormente se hicieron 4 lavados y se agregó 100µl del sustrato de TMB y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente en cámara oscura. Una vez terminado el tiempo se detuvo la reacción enzimática con ácido sulfúrico 2N. Finalmente se obtuvo las lecturas de absorbancias a una longitud de onda de 450nm con un filtro diferencial de 630nm. Se usó PBS para controlar el fondo y se agregaron los controles positivos y negativos respectivos. Las muestras fueron consideradas positivas si la densidad óptica ≥ 0.100 .

PCR para diagnóstico de Chikungunya

El PCR de diagnóstico o Screening para Chikungunya fue llevado a cabo en el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia de Nicaragua, y en colaboración con las bases de datos de las unidades de salud de León, se hizo la identificación de los participantes que tenían un PCR positivo.

Extracción de ADN de muestras de sangre para Genotipificación.

La extracción de ADN se realizó utilizando el kit comercial *QIAGEN GENTRA PUREGENE Blood Kit* (QIAGEN Sciences, Germantown, Maryland, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante (Gentra Puregene Handbook 06/2011). Un total de 600 µL de ADN fue obtenido y guardado a 20° C hasta su posterior análisis. Ver Apéndice N°3

Genotipificación de CCR5Δ32 por PCR

El ADN purificado de cada muestra fue analizado por el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la búsqueda de la delección de 32 pb en el gen CCR5. Las muestras fueron diluidas desde 1:10 hasta 1:1000 dependiendo de la concentración de ADN. En síntesis se tomó 1 µL de la muestra diluida, 12.5 µL

FastStar Universal SYBR Green Master (ROX) (ROCHE), 0.5 μ L (10 picomol/ μ L) de cada uno de los primers, (primers 5'-CACCTGCAGCTCTCATTTTCC-3' (forward) y 5'-GTTTTTAGGATTCCCGAGTAGCA-3' (reverse)) y 10.5 μ L de agua libre de nucleasas para un volumen final de 25 μ L para cada reacción. Se usó el equipo 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystem) y el programa del termociclado fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95 °C 10 minutos, luego 40 ciclos de; 95 °C por 30 segundos, 49 °C por 30 segundos, y 72 °C por 1 minuto. El PCR en este caso aunque se utilizó el sistema en tiempo real únicamente fue con el propósito de amplificación. Ver Apéndice N°4

Electroforesis

Los productos amplificados fueron separados por 45 minutos de electroforesis usando una cámara y fuente de energía modelo 200/20, ambas de Bio-Rad Laboratories, Inc., California, USA en un gel de agarosa (Fisher Bioreagents LOT102016) al 3% y visualizados por el tinte de bromuro de Etidio al exponerlo contra la luz ultravioleta (Fisher Scientific). El peso de los amplicones fue de 132 pb para el gen funcional (CCR5) y 100 pb para el gen no funcional o homocigoto (CCR5 Δ 32).

Análisis Estadísticos

Los datos obtenidos fueron introducidos en una base de datos diseñada en el programa SPSS, Inc. Chicago IL. (Statistical Package for the Social Sciences) versión 15.0.1.

Las frecuencias y porcentajes de cada una de las variables estudiadas fueron calculadas de forma separada en casos y controles. El grado de asociación entre la distribución de los marcadores genéticos (factor de riesgo), y la evidencia por Chikungunya se estableció mediante el cálculo de OR, la significancia estadística fue determinada con la prueba exacta Fisher y un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo.

Cuando la variable no fue dicotómica se hizo el OR utilizando como referencia aquel dato cuyos valores de N eran mayores.

Los gráficos se realizaron en Excel y los resultados se editaron en Word, ambos de Microsoft, y se utilizaron tablas y gráficos para presentar los resultados obtenidos.

Consideraciones Éticas

Este estudio fue revisado por el comité de ética para las investigaciones biomédicas de la UNAN-León, Nicaragua (Acta. N°37,2015).

A todos los participantes se les explicó los objetivos del estudio y se les solicitó la firma de un consentimiento informado. En caso de los participantes menores de edad se obtuvo un consentimiento informado del padre o tutor.

Todas las personas que fueron infectados con el Chikungunya y asistieron a una unidad de salud en el periodo de estudio, tuvieron igual oportunidad de participar en estudio.

9. Resultados

Perfil Epidemiológico de los pacientes con Chikungunya (casos). Este estudio incluyó personas que desarrollaron la enfermedad del Chikungunya entre Octubre del 2014 y Abril 2016. La mayoría de los casos estudiados fueron del área urbana (77% vs 23% del área rural) y del sexo femenino (62% vs 38% en hombres). También se observó que el grupo de edad más frecuente fue el de 16-30 años (51%), seguido por el de 31-45 años (20%), 46-60 (14%), ≥ 60 (8%) y en menor proporción se observaron los de 0-15 años con 7%.(Ver gráfico 1A).

Características Clínicas. El 60% los casos tuvieron fiebre de 1-3 días, el 25% hasta 6 días y 15% hasta 7 días o más. También se observó dolor de cabeza en 84% dolor general 79%, rash en 79%, debilidad en 76%, prurito en 75%, dolor retro orbital en 56%, náusea en 39%, dolor abdominal en 34%, vómito en 21% y sangrado espontáneo en 2%. (Ver tabla 1). El 38.6% de los pacientes presentó fiebre, prurito, dolor de cabeza, debilidad y rash.

Dolor. Durante la fase aguda el 100% de los pacientes presentó artralgias y las articulaciones más afectadas fueron: tobillos (83%), muñecas (78%), rodillas (77%), manos (74%), codos (50%), hombros (49%) y cuello (37%). En cambio en la fase post-Chikungunya la artralgia disminuyó pero prevaleció en tobillos (28%), rodillas (22%), manos (21%), muñecas(15%), hombros (6%) y cuello (3%). Es interesante mencionar que ningún paciente reportó artralgia en cadera (Ver tabla 2). El 55.8% presentó artralgia en manos y pies simultáneamente.

Inflamación. Durante la fase aguda el 59% de los pacientes presentó inflamación en al menos una articulación y los sitios más afectados fueron: pies (59%), y manos (59%), también se observó inflamación, aunque en menor proporción, en rodillas (12%), tobillos (10%), muñecas (6%) y cara (1%) En la fase post-Chikungunya la inflamación prevaleció en pies (11%), tobillos (5%), rodillas (3%) y manos (1%) (Ver tabla 3).

Reumatismo Crónico. El reumatismo crónico inflamatorio post-Chikungunya persistió durante 1 mes después de la fase aguda en un 63% de los casos estudiados, 2 meses

en 55%, 3 meses en 48%, 4 meses en 32% y 6 meses en 28%. Además se observó que el reumatismo crónico post – Chikungunya puede persistir en algunos casos hasta 21 meses. (Ver Gráfico 2).

Factores de Riesgo clínicos y epidemiológicos. En este estudio se encontró que los pacientes con al menos una enfermedad crónica (hipertensión, diabetes, asma y/o artritis) tienen mayor riesgo de desarrollar la enfermedad de Chikungunya (OR = 11.3, $P < 0.001$). De hecho, la infección sintomática o asintomática (presencia de IgG anti-Chikungunya) con el virus del Chikungunya fue significativamente más común en pacientes crónicos (OR = 6.21, $P \leq 0.005$). Otro factor asociado a la enfermedad es la presencia de contactos intra-domiciliares con Chikungunya (OR = 2.6, $P = P \leq 0.005$). La fumigación intra - domiciliar con una frecuencia ≥ 4 veces al mes disminuye el riesgo de Chikungunya (OR = 2.4, $P \leq 0.005$). También se encontró tendencia a la enfermedad en lugares donde el tren de aseo pasa con menos frecuencia 1 vez por semana (OR= 1.5, $P \geq 0.005$) y la existencia de predios baldíos en los alrededores (OR=1.2, $P = P \geq 0.005$). (Ver tabla 4 ,5 y 6)

Distribución y Asociación de los grupos histo - sanguíneos en la población. Las frecuencias de ABO, fueron similares tanto en casos (O=66%, A= 21%, B= 12% AB=1%) como en controles (O=68%, A= 21%, B= 9% AB=2%) y entre el fenotipo secretor y no secretor (87% Vs13%); (86% Vs14%). Las proporciones del fenotipo Lewis B fueron ligeramente mayores en controles (75%) que en casos (68%) (OR = 0.6, $P \geq 0.005$).

En cuanto al fenotipo Rh-negativo observamos que la proporción en los controles duplican la de los casos (6% vs 3%) sin embargo las diferencias no fueron significativas (OR 2.4, $P \geq 0.005$). En contraste, la proporción de Rh-positivo fue similar en casos como en controles. (97% vs 94%).

Circulación de la mutación CCR5 Δ 32 en la población de León. Este estudio demuestra la circulación de la mutación CCR5 Δ 32 en el 3% del total de casos y controles examinados, no se observó el genotipo recesivo, es decir, el alelo mutante solamente se observó en individuos heterocigoto. La proporción de controles con el

alelo mutante duplica la de casos (6% vs 3%), similarmente la frecuencia alélica de la mutación en los controles casi duplica la de los casos, (9/281 vs 5/285), es decir, está en desequilibrio, según Hardy-Weimberg. (OR = 0.54, $P \geq 0.005$) (Ver tabla 6 y Ver tabla 7)

Gráfico 1.A Histograma de frecuencia de edades de los casos (1.A) controles (1B) enrolados

Gráfico 1. A

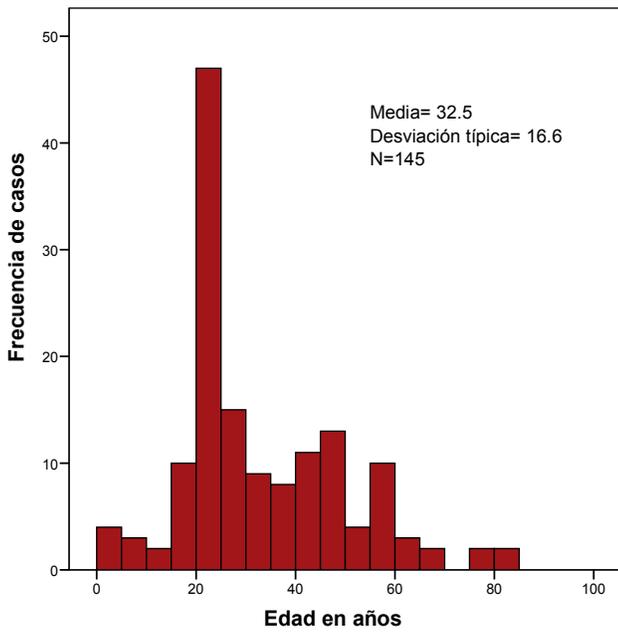


Gráfico 1. B

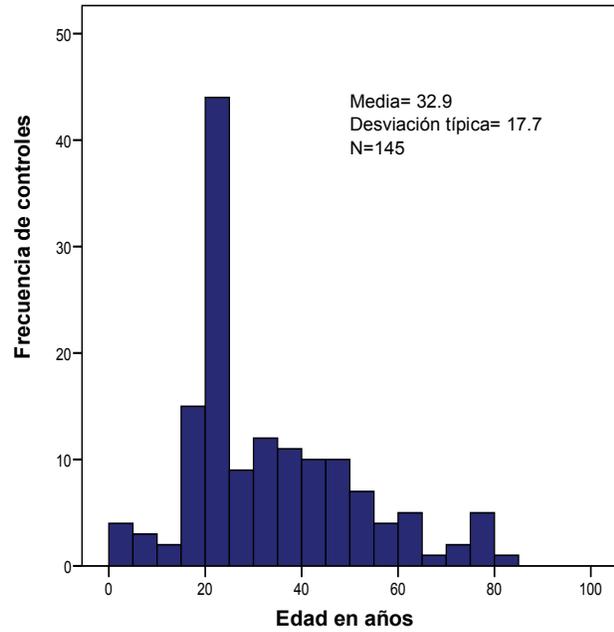


Tabla 1. Características clínicas de los casos enrolados de Chikungunya

	No. Casos (n = 145)	%
Fiebre	145	100
Días de fiebre		
1-3 días	87	60
4-6 días	36	25
7 a más	22	15
Dolor de cabeza	122	84
Dolor general	115	79
Rash	115	79
Debilidad	110	76
Prurito	109	75
Dolor Retro orbital	81	56
Nausea	56	39
Dolor Abdominal	50	34
Vomito	30	21
Sangrado Espontaneo	3	2
Total	145	100

Tabla 2. Frecuencia de dolor de los casos enrolados en fase aguda y fase Post - Chikungunya

	Fase Aguda	Fase Post - Chikungunya
	No (%) (n = 145)	No (%) (n = 145)
Dolor articular	145 (100)	92 (63)
Tobillos	120(83)	42 (28)
Muñecas	113(78)	22 (15)
Rodillas	112(77)	32 (22)
Manos	108(74)	31 (21)
Codos	72(50)	8(6)
Hombros	71 (49)	8 (6)
Cuello	53(37)	5 (3)

Tabla 3. Frecuencia de inflamación de los casos enrolados en fase aguda y fase Post -Chikungunya.

	Fase Aguda	Fase Post - Chikungunya
	No (%) (n = 145)	No (%) (n = 145)
Inflamación	85(59)	37 (26)
Pies	85(59)	16(11)
Manos	85(59)	2(1)
Rodillas	17(12)	5 (3)
Tobillos	14(10)	7 (5)
Muñecas	8(6)	0 (0)
Cara	2(1)	0 (0)

Gráfico 2. Reumatismo Crónico Post- Chikungunya de los casos enrolados.

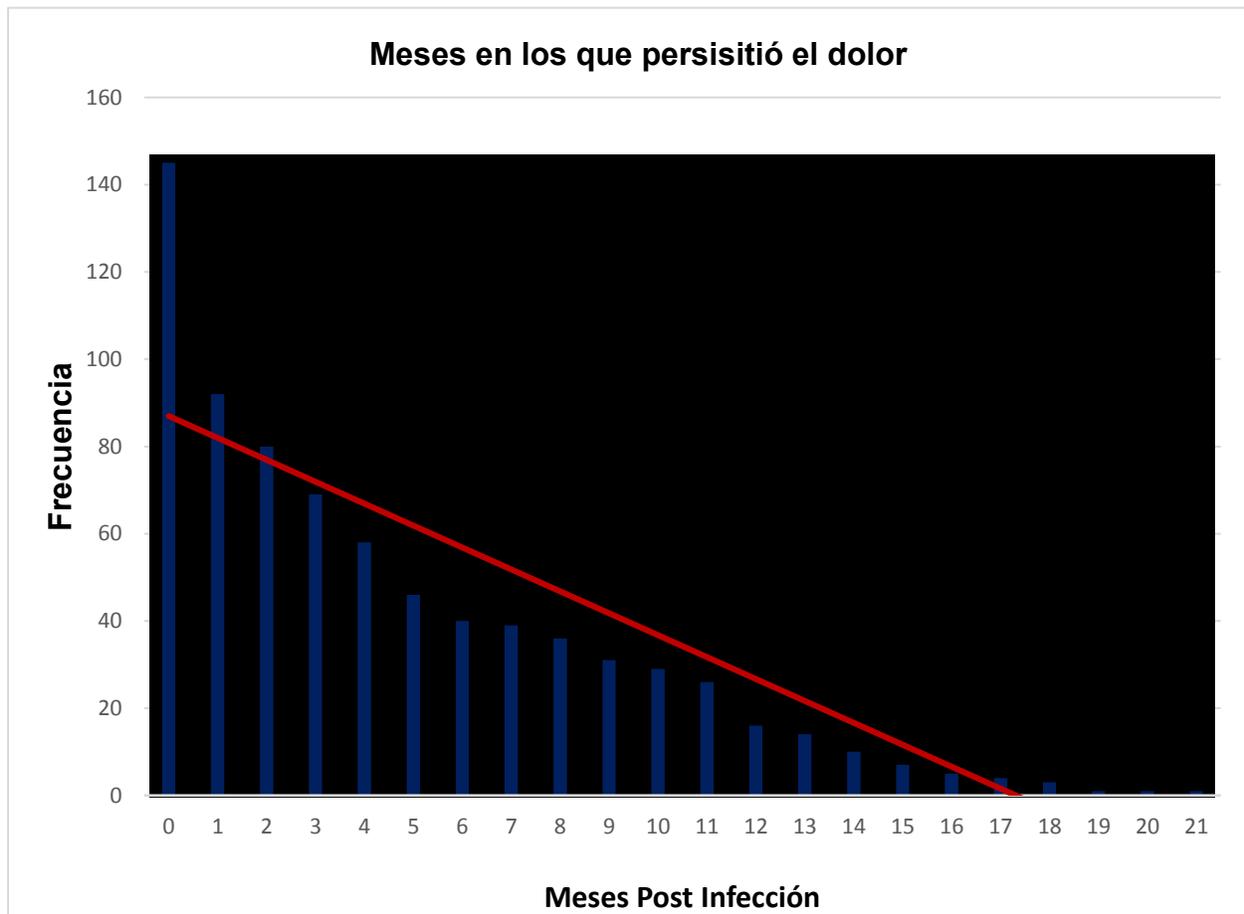


Tabla 4. Características epidemiológicas de los casos y controles enrolados.

	Casos No. (%)	Controles No. (%)	OR (IC 95%)	P
Edad				
0 - 15 años	9 (6)	10 (7)	1.2 (0.4 – 0.6)	0.3856
16 - 30 años	75 (52)	72 (50)	1 (0.6 - 1.6)	1.0000
31 - 45 años	29 (20)	30 (20)	1.1 (0.6 – 2.2)	0.4053
46 - 60 años	23 (16)	19 (13)	0.9 (0.4 – 1.7)	0.3372
≥ 60 años	9 (6)	14 (10)	1.6 (0.7 – 4.1)	0.1524
Enfermedades Crónicas*				
Si	28 (19)	3 (2)	11.3 (3.4 - 38)	0.0000
No	117 (81)	142 (98)		
Contactos Intra- domiciliare con Chikungunya				
Si	117 (81)	89 (62)	2.6 (1.6 -4.5)	0.0003
No	28 (19)	56 (38)		
Indice de masa Corporal				
Normal	64 (44)	69 (48)	1 (0.6 - 1.6)	1.0000
Bajo Peso	12 (8)	15 (10)	1.2(0.5- 2.7)	0.7273
Sobre Peso	26 (18)	20 (14)	1 (0.3- 1.6)	0.3348
Obesidad	43 (30)	41 (28)	0.8(0.5 - 1.5)	0.6595
Tren de Aseo				
0-1	68 (47)	54 (37)	1.5 (0.9 - 2.4)	0.0959
2-3	77 (53)	91 (63)		
Predios Baldíos				
Si	72 (50)	65 (45)	1.2 (0.8 - 1.9)	0.4103
No	73 (50)	80 (55)		
Fumigación Intra - domiciliar al mes				
0-1	44 (30)	51 (35)	1.5 (0.9 – 2.4)	0.1502
2-3	89 (62)	71 (49)	1 (0.6 – 1.6)	1.0000
4 a más	12 (8)	23 (16)	2.4 (1.1 -5.2)	0.0221
Total	145 (100)	145 (100)		

*Enfermedades crónicas encontradas: Hipertensión, diabetes, asma o artritis.

Tabla 5. IgG anti - Chikungunya Vs Enfermedad Crónicas

Enfermedad Crónicas*	IgG (+)	IgG (-)	OR (IC 95%)	P
SI	26	137		
No	4	123	5.8 (2-17.1)	0.0006
Total	30	260		

*Enfermedades crónicas encontradas: Hipertensión, diabetes, asma o artritis.

Tabla 6. Distribución y asociación de los grupos histo-sanguíneos y la mutación CCR5Δ32 en los casos y controles.

	Casos (%)	Controles (%)	OR (IC 95%)	P
ABO				
O	95 (66)	98 (68)	1 (0.6- 1.5)	0.9152
A	31 (21)	31 (21)	0.9 (0.5 - 1.7)	1.0000
B	18 (12)	13 (9)	0.7 (0.3 - 1.5)	0.3607
AB	1 (1)	3 (2)	2.9 (0.3 – 28.5)	0.3374
Fenotipo Rh				
Positivo	140 (97)	136(94)	2.0 (0.6 – 5.7)	0.2732
Negativo	5 (3)	9(6)		
Fenotipo Lewis				
Lewis B	98 (68)	108 (75)	1 (0.7- 1.5)	1.0000
Lewis –^a	29 (20)	21 (14)	0.6 (0.4 - 1.2)	0.1859
Lewis A	18 (12)	16 (11)	0.8 (0.4 - 1.7)	0.5617
Estado Secretor				
Se+^b	126 (87)	124 (86)	1.1 (0.6 - 2.2)	0.7334
Se-^c	19 (13)	21 (14)		
CCR5Δ32				
WT/WT^d	140 (97)	136 (94)	0.54 (0.2-1.7)	0.2732
WT/ Δ32^e	5 (3)	9 (6)		
Δ32/ Δ32^f	-	-	-	-
Total	145(100)	145 (100)		

^a Lewis Negativo Secretor No Secretor, ^d Tipo salvaje o Natural Homocigoto CCR5, ^e Heterocigoto de la mutación CCR5Δ32, ^f Homocigoto de la mutación CCR5Δ32.

Tabla 7. Frecuencias Alélicas del Genotipo CCR5Δ32

	Alelo Dominante	Heterocigoto	Alelo Recesivo	Frecuencia alélica CCR5Δ32
Casos	285	281	0	1% (~0.01)
Controles	5	9	0	2% (~0.02)
Total N = 290 (100%)	290	290	0	-

10. Discusión

En el estudio del desarrollo natural de la enfermedad por el virus del Chikungunya es imprescindible el análisis de múltiples factores que contribuyen con el desarrollo de la enfermedad como medioambientales, clínicos – epidemiológicos y genéticos. Con el propósito de aportar a la investigación de estos factores se realizó este estudio de casos y controles en el primer brote de Nicaragua, en la población de León.

Los factores ecológicos proveen de información complementaria del riesgo potencial que podría tener la población a ciertas enfermedades, este estudio reveló una tendencia a la enfermedad de Chikungunya en lugares donde el tren de aseo pasa con menos frecuencia y sumado a esto la existencia de predios baldíos alrededor de las viviendas. Como se ha descrito en otras arbovirosis la falta de frecuencia en la recolección de los desperdicios del hogar y la presencia de predios puede provocar la formación de criaderos de vectores y facilitar la propagación de los virus con mayor rapidez, aumentando el riesgo de infección y desarrollo de la enfermedad⁹⁷.

La fumigación de espacios intra - domiciliarios para el control de vectores realizada por el MINSA resultó ser un factor protector, demostrando así, que esta estrategia permite la destrucción rápida y masiva de la población de vectores adultos, y ayuda a disminuir la transmisión, aunque sea por periodos cortos de tiempo. En investigaciones de otras arbovirosis como el dengue, con quien comparte vector, la fumigación también ha resultado ser un factor importante en la lucha contra estos mosquitos que transmiten virus, aunque también es controversial porque depende del tipo de veneno, el tiempo estacional y el tiempo epidemiológico en el que se fumiga, los últimos mencionados no fueron evaluados en este estudio.⁹⁸⁻¹⁰⁰.

Interesantemente se observó que el grupo de edad más frecuente fue el de 16-30 años aunque la literatura expresa que los más afectados por el virus son los grupos de edades en los extremos de la vida (niños menores 5 años y adultos mayores de 65 años) ya sea porque el sistema inmunológico no está completamente desarrollado o porque se encuentra deprimido, en ambos casos las respuestas no son adecuadas sin embargo así también lo reportan otros investigadores en Nicaragua ¹⁰¹ Existe la

posibilidad de que este grupo de edades sea el más frecuente porque la población Nicaragüense es relativamente joven con un 60% de su población entre 0-30 años. ¹⁰²

Las enfermedades crónicas son un factor inmunológico predisponente para muchas enfermedades, ya que el sistema inmunológico de este grupo está generalmente deprimido, este estudio revela que tener una enfermedad crónica aumenta las probabilidades al individuo de desarrollar síntomas característicos de esta enfermedad. Interesantemente Schilte y col, encontró que los infectados con Chikungunya y con diabetes mellitus tienen más probabilidades de desarrollar artralgia severa. A diferencia de lo reportado por Economopoulou y col⁶⁶, donde refieren que las enfermedades crónicas son factores de riesgo independientes a la severidad de la enfermedad.

La presencia de un familiar con Chikungunya resultó ser un factor de riesgo. Se sabe que las probabilidades de infectarse con cualquier arbovirosis si alguien del hogar o cercano a la vivienda está infectado se duplican, ya que se completa el escenario perfecto (vector, reservorio, condiciones probables ambientales y un hospedero virgen) resultando en una transmisión casi segura.

Uno de los hallazgos más importantes del estudio fue la duración de los síntomas del reumatismo- crónico post Chikungunya, algunos de los enrolados llegaron a sufrir hasta 21 meses dolor e inflamación en los miembros como manos y pies. La respuesta inmunológica del huésped parece jugar un papel determinante en el desarrollo de la cronicidad de la enfermedad, Hoarau y col.⁷⁹ demostraron una robusta respuesta inmunológica con activación de células dendríticas, NK, CD4 y CD8 acompañada de una respuesta de citosina Th1y Th2 bastante débil, con altos niveles de IFN- α e IL-12 circulante que persistió durante meses. También encontraron ARN y proteínas virales rodeadas de NK y células T infiltrantes, en los macrófagos sinoviales perivasculares, en un paciente crónico. Todas estas observaciones celulares y moleculares podrían contribuir al desarrollo del reumatismo crónico Post Chikungunya. Esta afectación determinante en la enfermedad de Chikungunya ya que compromete la capacidad del desarrollo de actividades diarias y podría generar incapacidad crónica. Según Cardona y cols. se estima que de 1603 a 1783 personas en Nicaragua desarrollen reumatismo- crónico post - Chikungunya después de este primer brote, teniendo de esta forma

repercusiones económicas para las familias y el país en general.⁸. Además de la discapacidad es importante mencionar que esta puede prolongarse por más 3 años, así como lo refiere Pineda y col. en el que estiman que del 10% – 60% de los casos pueden llegar a sufrir reumatismo crónico post Chikungunya de 3- 5 años.¹⁰³

La respuesta inmunológica se midió a través del desarrollo de inmunoglobulina G anti – Chikungunya, tanto para casos como para controles, donde curiosamente se observó que algunos controles que no presentaron síntomas característicos de Chikungunya ni durante, ni después del brote si desarrollaron anticuerpos IgG anti – Chikungunya. Lo que sugiere que estuvieron expuestos al virus y desarrollaron una respuesta inmunológica silenciosa, que podría atribuirse a diversos factores que son merecedores de investigación. Un dato relevante en este estudio es que al comparar las frecuencias de IgG positiva tanto en casos como en controles con las enfermedades crónicas, se encontró que las personas con enfermedades crónicas tienen 6.21 veces más probabilidades de desarrollar sintomatología, sugiriendo que existe un factor del huésped que pudiese determinar la ausencia o presencia del desarrollo de síntomas, severidad y/o desarrollo de reumatismo crónico post-Chikungunya.

En relación a los factores genéticos ABO, Rh, Secretor, Lewis y CCR5Δ32 no se observaron diferencias estadísticamente significativas, aunque en Rh las frecuencias de los controles Rh negativo casi doblan las de casos sugiriendo que los Rh negativos podrían poseer un factor protector al desarrollo de la enfermedad, este mismo hallazgo fue observado por Kumar y col. en su estudio.¹²

Existen varios estudios donde se ha descrito la circulación del gen CCR5Δ32^{24, 28, 90}, cuyo origen es escandinavo, es importante decir que a partir de esta investigación se pudo evidenciar la circulación de la mutación en el gen CCR5Δ32 en la población de León lo que sustenta los hallazgos realizados por Wedel y col.²⁹. Sin embargo todavía estas muestras poblacionales son limitadas para extrapolar estos hallazgos a todo el país, debido a sus variantes étnicas sobre todo en la Costa Atlántica.

11. Conclusiones

- La mayoría de los casos estudiados presentaron: Dolor de cabeza (84%) Debilidad (76%), Prurito (75%) y 1-3 días de fiebre (60%). Durante la fase aguda las articulaciones más afectadas por artralgia fueron tobillo (83%), rodilla (77%), y manos (74%), pero en la fase Post Chikungunya prevaleció el dolor en tobillo (28%) y muñecas (15%). En la fase aguda presentaron inflamación mayormente en pies (59%) y manos (59%), pero solamente 11% y 1% presentaron inflamación en dichos miembros durante la fase post-Chikungunya, respectivamente.
- Los factores que mayormente contribuyen con la enfermedad fueron: enfermedades crónicas (OR = 11.3), familiar con Chikungunya (OR = 2.6) y la fumigación de espacios intra - domiciliario con una frecuencia de ≥ 4 veces por mes (OR = 2.4) como un factor protector.
- El reumatismo crónico inflamatorio post-Chikungunya persistió hasta 6 meses en el 28% de los casos y puede persistir en algunos casos hasta 21 meses.
- No se observaron diferencias significativas entre casos y controles en relación a los factores genéticos como; Tipo sanguíneo, Fenotipo de Lewis y Presencia del antígeno H.
- La delección en CCR5 Δ 32 no afectó la susceptibilidad a la enfermedad, sin embargo demuestra la circulación de la mutación CCR5 Δ 32 en el 5% del total de casos y controles examinados.

12. Recomendaciones

- Hacer un seguimiento de todos los casos enrolados y que presentaron reumatismo- crónico post- Chikungunya para evidenciar por cuánto tiempo más continuaron con la sintomatología
- Realizar un estudio en el que se tomen en cuenta otros factores genéticos que pudiesen explicar mejor la respuesta inmunológica diferenciada de los individuos frente al virus Chikungunya.

13. Referencias

1. Queyriaux B, Simon F, Grandadam M, Michel R, Tolou H and Boutin JP. Clinical burden of chikungunya virus infection. *Lancet Infect Dis*. 2008; 8: 2-3.
2. Staikowsky F, Talarmin F, Grivard P, et al. Prospective study of Chikungunya virus acute infection in the Island of La Reunion during the 2005-2006 outbreak. *PLoS One*. 2009; 4: e7603.
3. Burt FJ, Rolph MS, Rulli NE, Mahalingam S and Heise MT. Chikungunya: a re-emerging virus. *Lancet*. 2012; 379: 662-71.
4. Robinson MC. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1955; 49: 28-32.
5. Tan KK, Sy AK, Tandoc AO, et al. Independent Emergence of the Cosmopolitan Asian Chikungunya Virus, Philippines 2012. *Sci Rep*. 2015; 5: 12279.
6. Leperc-Goffart I, Nougaiere A, Cassadou S, Prat C and de Lamballerie X. Chikungunya in the Americas. *Lancet*. 2014; 383: 514.
7. PAHO. Chikungunya Statistics. Preliminary Cumulative Cases and Deaths for countries and Territories of the Americas. 2015.
8. Cardona-Ospina JA, Diaz-Quijano FA and Rodriguez-Morales AJ. Burden of chikungunya in Latin American countries: estimates of disability-adjusted life-years (DALY) lost in the 2014 epidemic. *Int J Infect Dis*. 2015; 38: 60-1.
9. OMS OMDIS. Chikungunya Nota descriptiva Abril 2016 2015, p. Centro de Prensa
10. Fox JM and Diamond MS. Immune-Mediated Protection and Pathogenesis of Chikungunya Virus. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2016; 197: 4210-8.
11. Kuan G, Ramirez S, Gresh L, et al. Seroprevalence of Anti-Chikungunya Virus Antibodies in Children and Adults in Managua, Nicaragua, After the First Chikungunya Epidemic, 2014-2015. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016; 10.
12. Kumar NC, Nadimpalli M, Vardhan VR and Gopal SD. Association of ABO blood groups with Chikungunya virus. *Viol J*. 2010; 7: 140.
13. Rujirojindakul P, Chongsuivatwong V and Limprasert P. Association of ABO Blood Group Phenotype and Allele Frequency with Chikungunya Fever. *Adv Hematol*. 2015; 2015: 543027.
14. Lokireddy S, Sarojamma V and Ramakrishna V. Genetic predisposition to chikungunya--a blood group study in chikungunya affected families. *Viol J*. 2009; 6: 77.
15. Bucardo F, Kindberg E, Paniagua M, et al. Genetic susceptibility to symptomatic norovirus infection in Nicaragua. *J Med Virol*. 2009; 81: 728-35.
16. Nordgren J, Sharma S, Bucardo F, et al. Both Lewis and secretor status mediate susceptibility to rotavirus infections in a rotavirus genotype-dependent manner. *Clin Infect Dis*. 2014; 59: 1567-73.
17. Lezama P. Rol de quimiocinas y sus receptores en la inflamacion *Revista Vallejana* 3: 133-9 (2006).
18. Novembre J, Galvani AP and Slatkin M. The geographic spread of the CCR5 Delta32 HIV-resistance allele. *PLoS biology*. 2005; 3: e339.
19. Kindberg E, Mickienè A, Ax C, et al. A Deletion in the Chemokine Receptor 5 (CCR5) Gene Is Associated with Tickborne Encephalitis. *The Journal of Infectious Diseases*. 2008; 197: 266-9.
20. Glass WG, Lim JK, Cholera R, Pletnev AG, Gao JL and Murphy PM. Chemokine receptor CCR5 promotes leukocyte trafficking to the brain and survival in West Nile virus infection. *The Journal of experimental medicine*. 2005; 202: 1087-98.
21. Marques RE, Guabiraba R, Del Sarto JL, et al. Dengue virus requires the CC-chemokine receptor CCR5 for replication and infection development. *Immunology*. 2015; 145: 583-96.

22. Broeckel R, Haese N, Messaoudi I and Streblow DN. Nonhuman Primate Models of Chikungunya Virus Infection and Disease (CHIKV NHP Model). *Pathogens*. 2015; 4: 662-81.
23. Lucotte G. Distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion in West Europe. A hypothesis about the possible dispersion of the mutation by the Vikings in historical times. *Human immunology*. 2001; 62: 933-6.
24. Maier-Moore JS, Canas CA, Tobon G, Arango A, Anaya JM and Scofield RH. The CCR5 delta 32 polymorphism (rs333) is not associated with Sjogren's syndrome or Type 1 Diabetes in Colombians. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2013; 148: 206-8.
25. Diaz FJ, Vega JA, Patino PJ, et al. Frequency of CCR5 delta-32 mutation in human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and HIV-exposed seronegative individuals and in general population of Medellin, Colombia. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2000; 95: 237-42.
26. Zapata W, Aguilar-Jimenez W, Pineda-Trujillo N, Rojas W, Estrada H and Rugeles MT. Influence of CCR5 and CCR2 genetic variants in the resistance/susceptibility to HIV in serodiscordant couples from Colombia. *AIDS research and human retroviruses*. 2013; 29: 1594-603.
27. Paz-y-Mino C, Morillo SA, Celi AP, et al. CCR5delta32, CCR2-64I, and SDF1-3'A polymorphisms related to resistance to HIV-1 infection and disease in the Ecuadorian population. *Human biology*. 2005; 77: 521-6.
28. Vargas AE, Marrero AR, Salzano FM, Bortolini MC and Chies JA. Frequency of CCR5delta32 in Brazilian populations. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 2006; 39: 321-5.
29. Wedel A. WJ. Can host genetic factors affect severity of Dengue virus infection? The role of cystein-cystein chemokine receptor 5 (CCR5). Medical Tesis ed.: Medical Linköping University, Sweden, 2016.
30. Liu R, Paxton WA, Choe S, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*. 1996; 86: 367-77.
31. Nakao E. Biological and immunological studies on chikungunya virus: a comparative observation of two strains of African and Asian origins. *The Kobe journal of medical sciences*. 1972; 18: 133-41.
32. Berger SA. GIDEON: a comprehensive Web-based resource for geographic medicine. *International journal of health geographics*. 2005; 4: 10.
33. Chastel C. [Chikungunya virus: its recent spread to the southern Indian Ocean and Reunion Island (2005-2006)]. *Bulletin de l'Academie nationale de medecine*. 2005; 189: 1827-35.
34. Ravi V. Re-emergence of chikungunya virus in India. *Indian journal of medical microbiology*. 2006; 24: 83-4.
35. Van Bortel W, Dorleans F, Rosine J, et al. Chikungunya outbreak in the Caribbean region, December 2013 to March 2014, and the significance for Europe. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2014; 19.
36. CDC. Chikungunya Virus. Countries and territories where chikungunya cases have been reported* (as of October 20, 2015). 2015.
37. Weaver SC. Arrival of chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014; 8: e2921.
38. Singh SK and Unni SK. Chikungunya virus: host pathogen interaction. *Reviews in medical virology*. 2011; 21: 78-88.
39. Solignat M, Gay B, Higgs S, Briant L and Devaux C. Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. *Virology*. 2009; 393: 183-97.
40. Li L, Jose J, Xiang Y, Kuhn RJ and Rossmann MG. Structural changes of envelope proteins during alphavirus fusion. *Nature*. 2010; 468: 705-8.

41. Voss JE, Vaney MC, Duquerroy S, et al. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature*. 2010; 468: 709-12.
42. Klimstra WB, Nangle EM, Smith MS, Yurochko AD and Ryman KD. DC-SIGN and L-SIGN can act as attachment receptors for alphaviruses and distinguish between mosquito cell- and mammalian cell-derived viruses. *J Virol*. 2003; 77: 12022-32.
43. Bernard E, Solignat M, Gay B, et al. Endocytosis of chikungunya virus into mammalian cells: role of clathrin and early endosomal compartments. *PLoS One*. 2010; 5: e11479.
44. Gay B, Bernard E, Solignat M, Chazal N, Devaux C and Briant L. pH-dependent entry of chikungunya virus into *Aedes albopictus* cells. *Infect Genet Evol*. 2012; 12: 1275-81.
45. Griffin DEF. *Virology*. 5th edn ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
46. Brehin AC, Rubrecht L, Navarro-Sanchez ME, et al. Production and characterization of mouse monoclonal antibodies reactive to Chikungunya envelope E2 glycoprotein. *Virology*. 2008; 371: 185-95.
47. Ozden S, Lucas-Hourani M, Ceccaldi PE, et al. Inhibition of Chikungunya virus infection in cultured human muscle cells by furin inhibitors: impairment of the maturation of the E2 surface glycoprotein. *J Biol Chem*. 2008; 283: 21899-908.
48. Schwartz O and Albert ML. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8: 491-500.
49. Ng LC and Hapuarachchi HC. Tracing the path of Chikungunya virus--evolution and adaptation. *Infect Genet Evol*. 2010; 10: 876-85.
50. Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE and Higgs S. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog*. 2007; 3: e201.
51. Wang C, Saborio S, Gresh L, et al. Chikungunya Virus Sequences Across the First Epidemic in Nicaragua, 2014-2015. *Am J Trop Med Hyg*. 2016; 94: 400-3.
52. Deeba F, Islam A, Kazim SN, et al. Chikungunya virus: recent advances in epidemiology, host pathogen interaction and vaccine strategies. *Pathogens and disease*. 2016; 74.
53. Powers AM and Logue CH. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J Gen Virol*. 2007; 88: 2363-77.
54. Diallo M, Thonnon J, Traore-Lamizana M and Fontenille D. Vectors of Chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1999; 60: 281-6.
55. Weaver SC and Forrester NL. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. *Antiviral Res*. 2015; 120: 32-9.
56. Weaver SC and Lecuit M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. *N Engl J Med*. 2015; 372: 1231-9.
57. WHO. International conference on mosquito control: recommendations. *wkly epidem Rep* 2000, p. 173-5.
58. de Lamballerie X, Leroy E, Charrel RN, Tsetsarkin K, Higgs S and Gould EA. Chikungunya virus adapts to tiger mosquito via evolutionary convergence: a sign of things to come? *Virol J*. 2008; 5: 33.
59. Cordel H, Quatresous I, Paquet C and Couturier E. Imported cases of chikungunya in metropolitan France, April 2005 - February 2006. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2006; 11: E060420 3.
60. Pialoux G, Gauzere BA, Jaureguiberry S and Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *Lancet Infect Dis*. 2007; 7: 319-27.
61. Ernould S, Walters H, Alessandri JL, et al. [Chikungunya in paediatrics: epidemic of 2005-2006 in Saint-Denis, Reunion Island]. *Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie*. 2008; 15: 253-62.

62. Couderc T and Lecuit M. Chikungunya virus pathogenesis: From bedside to bench. *Antiviral Res.* 2015; 121: 120-31.
63. Borgherini G, Poubeau P, Staikowsky F, et al. Outbreak of chikungunya on Reunion Island: early clinical and laboratory features in 157 adult patients. *Clin Infect Dis.* 2007; 44: 1401-7.
64. Robin S, Ramful D, Zettor J, et al. Severe bullous skin lesions associated with Chikungunya virus infection in small infants. *Eur J Pediatr.* 2010; 169: 67-72.
65. Ritz N, Hufnagel M and Gerardin P. Chikungunya in Children. *Pediatr Infect Dis J.* 2015; 34: 789-91.
66. Economopoulou A, Dominguez M, Helynck B, et al. Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Reunion. *Epidemiol Infect.* 2009; 137: 534-41.
67. Ozden S, Huerre M, Riviere JP, et al. Human muscle satellite cells as targets of Chikungunya virus infection. *PLoS One.* 2007; 2: e527.
68. Couderc T, Chretien F, Schilte C, et al. A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. *PLoS Pathog.* 2008; 4: e29.
69. Jaffar-Bandjee MC, Das T, Hoarau JJ, et al. Chikungunya virus takes centre stage in virally induced arthritis: possible cellular and molecular mechanisms to pathogenesis. *Microbes Infect.* 2009; 11: 1206-18.
70. Jaffar-Bandjee MC and Gasque P. [Physiopathology of chronic arthritis following chikungunya infection in man]. *Med Trop (Mars).* 2012; 72 Spec No: 86-7.
71. Ekchariyawat P, Hamel R, Bernard E, et al. Inflammasome signaling pathways exert antiviral effect against Chikungunya virus in human dermal fibroblasts. *Infect Genet Evol.* 2015; 32: 401-8.
72. Akira S and Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature reviews Immunology.* 2004; 4: 499-511.
73. Muzio M, Ni J, Feng P and Dixit VM. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science (New York, NY).* 1997; 278: 1612-5.
74. Frolova EI, Fayzulin RZ, Cook SH, Griffin DE, Rice CM and Frolov I. Roles of nonstructural protein nsP2 and Alpha/Beta interferons in determining the outcome of Sindbis virus infection. *J Virol.* 2002; 76: 11254-64.
75. Litzba N, Schuffenecker I, Zeller H, et al. Evaluation of the first commercial chikungunya virus indirect immunofluorescence test. *Journal of Virological Methods.* 2008; 149: 175-9.
76. Kam YW, Lum FM, Teo TH, et al. Early neutralizing IgG response to Chikungunya virus in infected patients targets a dominant linear epitope on the E2 glycoprotein. *EMBO Molecular Medicine.* 2012; 4: 330-43.
77. Petitdemange C, Wauquier N, Jacquet JM, Theodorou I, Leroy E and Vieillard V. Association of HLA class-I and inhibitory KIR genotypes in Gabonese patients infected by Chikungunya or Dengue type-2 viruses. *PLoS One.* 2014; 9: e108798.
78. Petitdemange C, Becquart P, Wauquier N, et al. Unconventional Repertoire Profile Is Imprinted during Acute Chikungunya Infection for Natural Killer Cells Polarization toward Cytotoxicity. *PLoS Pathog.* 2011; 7: e1002268.
79. Hoarau J-J, Jaffar Bandjee M-C, Krejbich Trotot P, et al. Persistent Chronic Inflammation and Infection by Chikungunya Arthritogenic Alphavirus in Spite of a Robust Host Immune Response. *The Journal of Immunology.* 2010; 184: 5914-27.
80. Morrison TE, Oko L, Montgomery SA, et al. A Mouse Model of Chikungunya Virus-Induced Musculoskeletal Inflammatory Disease. *The American Journal of Pathology.* 178: 32-40.

81. Komatsu N and Takayanagi H. Chapter 2 - Autoimmune Arthritis: The Interface Between the Immune System and Joints. In: Frederick WA, (ed.). *Advances in Immunology*. Academic Press, 2012, p. 45-71.
82. García CA. Sistema de grupo sanguíneo ABO. *Medicina y Laboratorio* Editora medica Colombiana S.A 2009.
83. Harmening DM. *Modern Blood Banking and Transfusion Practices*. 4 ed. Philadelphia,US: Davis Company, 1999.
84. Varela T. Varela T. Aspectos geneticos del sistema lewis.: 4-5 (1987).
85. Cook N. *Viruses in Food and Water: Risks, Surveillance and Control*. Elsevier Science, 2013.
86. Payne DC, Currier RL, Staat MA, et al. Epidemiologic Association Between FUT2 Secretor Status and Severe Rotavirus Gastroenteritis in Children in the United States. *JAMA Pediatr*. 2015: 1-6.
87. Murray PR, Rosenthal KS and Pfaller MA. *Microbiología médica, 6a ed*. Elsevier, 2009.
88. Resino S. Actividad Biologica de las Quimiocinas EMEI: Epidemiología Molecular de Enfermedades Infecciosas 2009, p. Generalidades Quimiocinas
89. Aliberti J, Reis e Sousa C, Schito M, et al. CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. *Nature immunology*. 2000; 1: 83-7.
90. Samson M, Libert F, Doranz BJ, et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*. 1996; 382: 722-5.
91. Dash Muktikesh MI, Padhi Sanghamitra Laboratory diagnosis of chikungunya virus: Do we really need it? *Indian Journal Of Medical Science* 2011; 65: 83-91.
92. OPS Ca. Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus chikungunya en las Américas. 2011.
93. Mardekian SK and Roberts AL. Diagnostic Options and Challenges for Dengue and Chikungunya Viruses. *BioMed Research International*. 2015; 2015.
94. Pastorino B, Bessaud M, Grandadam M, Murri S, Tolou HJ and Peyrefitte CN. Development of a TaqMan® RT-PCR assay without RNA extraction step for the detection and quantification of African Chikungunya viruses. *Journal of Virological Methods*. 2005; 124: 65-71.
95. Carletti F, Bordi L, Chiappini R, et al. Rapid detection and quantification of Chikungunya virus by a one-step reverse transcription polymerase chain reaction real-time assay. *Am J Trop Med Hyg*. 2007; 77: 521-4.
96. Dean AG SK, Soe MM. OpenEPI:Open Source Version 3.01 ed. 2013, p. Epidemiologic Statistics for Public Health, .
97. Almeida AS, Medronho Rde A and Valencia LI. Spatial analysis of dengue and the socioeconomic context of the city of Rio de Janeiro (Southeastern Brazil). *Revista de saude publica*. 2009; 43: 666-73.
98. Phillips ML. Dengue Reborn: Widespread Resurgence of a Resilient Vector. *Environmental Health Perspectives*. 2008; 116: A382-8.
99. Dantur Juri MJ, Zaidenberg M and Santana M. The efficacy of a combined larvicide-adulticide in ultralow volume and fumigant canister formulations in controlling the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Northwest of Argentina. *Parasitology research*. 2013; 112: 1237-46.
100. Oki M, Sunahara T, Hashizume M and Yamamoto T. Optimal timing of insecticide fogging to minimize dengue cases: modeling dengue transmission among various seasonalities and transmission intensities. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011; 5: e1367.
101. Kuan G, Ramirez S, Gresh L, et al. Seroprevalence of Anti-Chikungunya Virus Antibodies in Children and Adults in Managua, Nicaragua, After the First Chikungunya Epidemic, 2014-2015. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016; 10: e0004773.
102. Nicaragua BCd. Nicaragua en cifras. INIDE.gob.ni2012.

103. Pineda C, Munoz-Louis R, Caballero-Urbe CV and Viasus D. Chikungunya in the region of the Americas. A challenge for rheumatologists and health care systems. *Clinical rheumatology*. 2016; 35: 2381-5.

14. Apéndices

Apéndice N°1.Consentimiento

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA (UNAN – LEÓN)

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

Departamento de Microbiología

Estudio: Susceptibilidad genética asociada al virus del Chikungunya

Código Laboratorio: ID: CHIK-□□□-□□□

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Contexto:

El virus del Chikungunya es una infección emergente, con una alta prevalencia y probabilidad de incrementar en los próximos años. Según la Organización Panamericana de la Salud en Nicaragua se han reportado alrededor de 6,000 casos confirmados de Chikungunya y con un caso fatal. Recientes estudios en países asiáticos han encontrado que algunos factores genéticos podrían estar relacionados con la susceptibilidad a las infecciones con Chikungunya.

Objetivo del estudio:

Este estudio ayudará a los Doctores a comprender mejor la enfermedad del Chikungunya para establecer mejores medidas de prevención y tratamiento. Todavía se necesita mejorar los métodos de diagnóstico y comprender como se produce la enfermedad. En este estudio participaran 100 personas que han padecido Chikungunya y 100 personas que no hayan padecido la enfermedad, pero que viven en el mismo hogar o vecindario.

¿Qué se necesita de usted durante el estudio?

Durante la entrevista, usted responderá preguntas relacionadas a su salud, factores epidemiológicos y demográficos. La entrevista tomará aproximadamente 10 minutos. Usted puede rehusarse a contestar cualquiera de las preguntas. Los investigadores obtendrán información complementaria mediante el análisis de muestras. Si usted estuvo infectado o en contacto con personas previamente enfermas con Chikungunya, una enfermera colaboradora de este estudio tomará una muestra de sangre (3cc) de su brazo y una muestra de saliva (3cc).

Beneficios:

Aunque no existen beneficios directos por participar en este estudio, ayudará a los doctores a incrementar su entendimiento sobre la enfermedad producida por el virus del Chikungunya. Este estudio ayudará a entender cómo reaccionan las personas al

Chikungunya en dependencia de sus factores genéticos y epidemiológicos. Como beneficio adicional los análisis de laboratorio le serán proporcionados por la enfermera.

Riesgos:

Es posible que sienta una pequeña molestia, enrojecimiento o dolor en el sitio de su brazo donde la sangre es extraída.

Resumen:

La participación en este estudio es voluntaria y si usted no desea ser parte de este estudio, cualquier atención médica que esté recibiendo o pudiesen recibir en el futuro no será afectada de ninguna manera.

Confidencialidad:

La información que permite reconocerlo, incluyendo información personal y médica obtenida en este estudio, será mantenida bajo estricta confidencialidad, asegurada bajo llave en la oficina del Dr. Filemón Bucardo, en el Departamento de Microbiología de la UNAN-León. A los participantes se les asignará un número de identificación único. El nombre o información que permita identificarlo NO será utilizada en las publicaciones o presentaciones. La información de salud personal que no sea requerida para cumplir con los propósitos descritos será destruida, borrada o anónima.

Todas las muestras serán guardadas refrigeradores del laboratorio de Microbiología de la UNAN-León. La identificación de la muestra será a través del número único de identificación. Los individuos que realicen el análisis de las muestras no tendrán acceso a ninguna información del paciente. Su privacidad será respetada. Ninguna información que revele su identidad será liberada o publicada.

Consentimiento:

1. Yo entiendo que estoy siendo invitado a formar parte de este estudio porque estuve enfermo de Chikungunya o vivo en la misma casa o vecindario de una persona que estuvo enferma.
2. Yo entiendo que las enfermeras y estudiantes de este estudio me realizarán preguntas sobre mi salud y/o enfermedad.
3. Yo entiendo que la participación en el estudio es voluntaria y si yo no deseo ser parte del estudio, cualquier atención médica que esté recibiendo o pueda recibir en el futuro no será afectada de ninguna manera.
4. Puedo rehusarme a participar, en el estudio en cualquier momento, sin que la atención médica sea afectada.
5. Yo entiendo que una enfermera me tomará una muestra de sangre del brazo y una muestra de saliva.

6. Yo entiendo que los investigadores pueden, con mi consentimiento, obtener información importante de los registros médicos, lo que puede incluir: resultados de pruebas de laboratorio e historia clínica.
7. Yo entiendo que recibiré una copia firmada de este consentimiento para mi persona.
8. Yo entiendo que si tengo otras preguntas, puedo preguntarle al Dr. Filemón Bucardo llamándolo al 2311-0022 ext 2155.

Si tengo cualquier pregunta respecto a mis derechos como participante en la investigación, me puedo contactar con la Oficina del comité de ética para las investigaciones biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNAN-León.

Registros Médicos:

Al seleccionar “SÍ” Yo autorizo la liberación de los registros médicos a los investigadores involucrados en el estudio “**Susceptibilidad genética asociada a Chikungunya**” para los propósitos de investigación descritos anteriormente.

SÍ: _____ **NO:** _____

Uso de la muestra para futuras investigaciones:

Yo estoy de acuerdo en permitir la toma y almacenamiento de muestras de mi sangre y saliva para investigaciones y estudios genéticos e inmunológicos futuros, sobre el virus del Chikungunya y otras enfermedades infecciosas, aprobados por el Comité de Ética para las investigaciones Biomédicas de la UNAN-León. Yo entiendo que marcando la opción “SI” a continuación doy permiso para utilizar las muestras almacenadas para investigaciones futuras. Yo entiendo que si selecciono “NO”, estoy solicitando que las muestras almacenadas sean destruidas al final de este estudio.

SÍ: _____ **NO:** _____

Consentimiento:

Su firma en este documento indica que usted entendió la información respecto a su participación en el estudio “Susceptibilidad Genética a Chikungunya”. De ninguna forma esto lo hace renunciar a sus derechos legales tampoco libera al investigador, o instituciones involucradas de sus responsabilidades legales y profesionales. Usted está en la libertad de retirarse en cualquier momento del estudio sin poner afectar su atención médica.

Nombre del Participante

Fecha

Consentimiento administrado, explicado y atestiguado en persona por:

Nombre y título	Firma	Fecha
Nombre del Investigador	Firma	Fecha

Completar solamente si el participante no sabe leer ni escribir.

Nombre del participante	Huella digital del Participante	Fecha
Nombre del Testigo	Firma del testigo	Fecha

Consentimiento administrado, explicado y atestiguado en persona por:

Nombre y título	Firma	Fecha
Nombre Investigador	Firma	Fecha

ID: RS-□□□□-□□-□□ Iniciales del Participante:□□□

Susceptibilidad Genética a Chikungunya.

Investigadores del estudio:

Dr. Filemon Bucardo-Rivera,

Professor Titular
Facultad de Ciencias Medicas
Departamento de Microbiología.
UNAN-León
Tel/Fax: 2311-0022
E: fili_bucardo@hotmail.com

Dr. Johan Nordgren.

Post-doctoral Fellows
Virología Molecular
Facultad de Ciencias Medicas
Universidad de Linköping, Suecia
johan.nordgren@liu.se

Fabian Liljedahl

Estudiante de 3^{er} año de Medicina
Facultad de Medicina
Universidad de Linköping, Suecia
Liljedahl.fabian@gmail.com

Lic. Marlen Patricia Morales.

Estudiante de maestría en
Microbiología
Facultad de Ciencias Médicas
Departamento de Microbiología
UNAN- León.
marlenpatrikmorales@gmail.com

Apéndice 2. Cuestionario

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA (UNAN – LEÓN)
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
Departamento de Microbiología

Estudio: Susceptibilidad genética asociada con Chikungunya

Código Laboratorio: **ID: CHIK-**□□□-□□□

Ficha de recolección de información

Código de Campo: ___/___/___

C / M / N

Saliva _____ Sangre _____

Fecha: _____

DATOS GENERALES:

Nombre y Apellido: _____

Fecha de Nacimiento: ___/___/___ Sexo: Masculino: /___/

Femenino: /___/

Edad: ___ Peso: ___ kg Altura: ___ cm Perímetroabdominal: ___ cm

Procedencia: Urbana: /___/ Rural: /___/

Dirección:

Localidad:

DATOS CLÍNICOS Y EPIDEMIOLÓGICOS:

SALUD: ¿Tuvo alguna enfermedad infecciosa antes de tener Chikungunya?

Si/___/ No/___/; en caso de SI, indique cuales: _____

¿Tiene alguna enfermedad crónica?

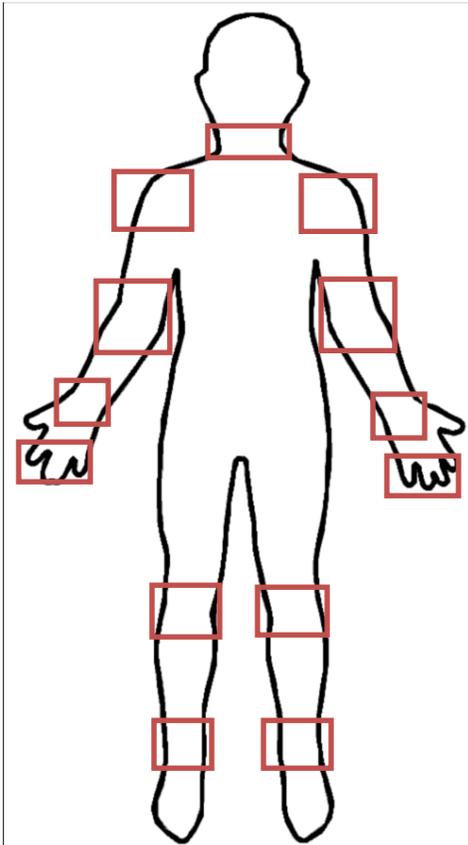
Si/ ___ / No/ ___ /; En caso de SI, indique cuales:

- Diabetes Tratamiento: _____
- Hipertensión Tratamiento: _____
- Cáncer Tratamiento: _____ Quimioterapia: _____
- Artritis reumatoide Tratamiento: _____
- Otros
- Indique cuales: _____ Tratamiento: _____

¿Se ha hecho exámenes de colesterol?

Si/ ___ / No/ ___ /; en caso de SI, marque: Alto: _____ Normal: _____

¿Qué partes del cuerpo le dolían durante la enfermedad? Marque en el dibujo:



¿Qué partes del cuerpo estaban inflamadas durante la enfermedad? _____

¿En qué mes tuve Chikungunya? _____

Julio 2014 _____

Augusto 2014 _____

Septiembre 2014 _____

Octubre 2014 _____

Noviembre 2014 _____

Diciembre 2014 _____

Enero 2015 _____

Febrero 2015 _____

Marzo 2015 _____

¿Cuáles síntomas tuvo durante la enfermedad? Marque en la lista abajo:

Fiebre _____ Número de días _____

Dolores articulares _____

Inflamación de pies o manos _____

Rash _____

Dolor de cabeza _____

Picazón _____

Nausea _____

Vomito _____

Dolor detrás de los ojos _____

Dolor abdominal _____

Sangrado espontáneo _____

Rash en las palmas de los manos _____

Dolor generalizado _____

Debilidad / decaimiento _____

Otros, explique:

CONDICIONES DE VIVIENDA:

Tipo de piso:

Cemento: _____ Tierra: _____ Cerámica/Ladrillo: _____

Tipo de pared:

Latón/plástico: _____ Ladrillo/bloque: _____

Electricidad: Si: _____ No: _____

Internet en casa: Si: _____ No: _____

Disposición de excretas: Letrina: Si: _____ No: _____ Inodoro: Si: _____ No: _____

Fecalismo: Si: _____ No: _____

Número de personas que viven en la casa:

Número total: _____ Niños: _____ Adultos: _____ Ancianos: _____

Tipo de agua que consumen:

Pozo _____ Potable: _____ Río: _____

¿Almacena agua?

Si _____ No _____; En caso de SI, indique:
Cómo _____ y dónde _____

Cada cuanto tiempo la reemplaza

¿Existen basureros clandestinos en el vecindario? Sí _____ No _____

¿Cada cuánto pasa el camión de la basura?

Una vez a la semana _____

Tres veces a la semana _____

Nunca _____

¿Existen predios baldíos alrededor del hogar?

Sí _____ No _____

Educación:

Primaria: _____ Secundaria: _____ Universidad: _____

Ocupación/trabajo: _____

Ambiente cerrado / horas _____ Ambiente abierto / horas

¿Antes del episodio, había viajado fuera del país?

Si _____ No _____ en caso de SI, indique donde: _____

¿Visitó a alguien con Chikungunya antes de la infección?

Sí _____ No _____

¿Alguien más ha tenido Chikungunya en su casa?

Sí _____ No _____; en caso de SI, indique parentesco: _____

¿Tiene animales en casa?

Si / ____ / No / ____ /; en caso de SI
indique cuales:

Perros: ____

Gatos: ____

Loro: ____

Murciélagos: ____

Ratones: ____

Gallinas: ____

Perro zompopo: ____

Otros, indique cuales: ____

¿En el último mes, cada cuanto pasa fumigando el MINSA su casa?

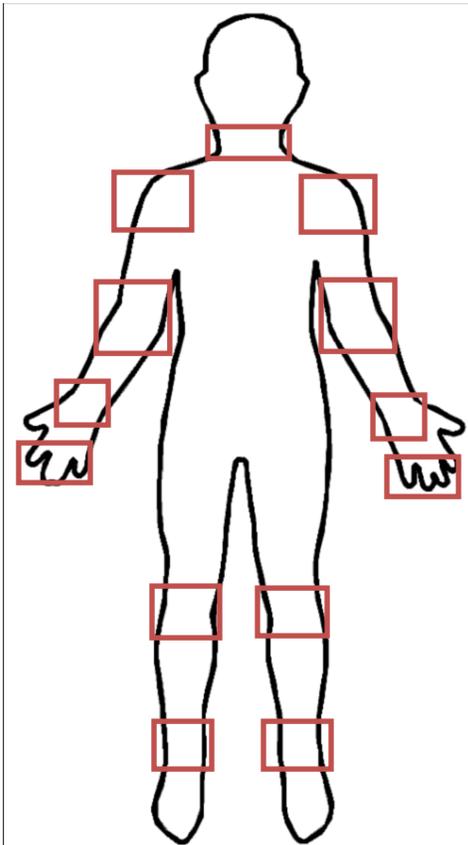
Una ____ Dos ____ Nunca ____

¿Usa alguna de las siguientes?

Mosquitero ____ Repelente ____ Candelas repelentes ____ Otros, indique
cuales: _____

¿Persiste algún dolor luego de la enfermedad?

Si ____ No ____ En caso de SI, marque en el dibujo:



¿Qué partes del cuerpo aún se le inflaman? _____

¿Por cuantos meses persistió el dolor? Marque en la lista abajo:

Julio 2014 _____
Agosto 2014 _____
Septiembre 2014 _____
Octubre 2014 _____
Noviembre 2014 _____
Diciembre 2014 _____
Enero 2015 _____
Febrero 2015 _____
Marzo 2015 _____

Abril 2015 _____
Mayo 2015 _____
Junio 2015 _____
Julio 2015 _____
Agosto 2015 _____
Septiembre 2015 _____
Octubre 2015 _____
Noviembre 2015 _____
Diciembre 2015 _____

RESULTADOS DEL LABORATORIO:

<p>Lewis: A/____/ B/____/ A⁻B⁻/____/</p> <p>Tipo ABO: A/____/ B/____/ AB/____/ O/____/</p> <p>Rh: positivo/____/ negativo/____/</p> <p>Secretor: positivo/_____/ negativo/_____/</p>
<p>Valor de absorbancia</p> <p>IgM suero: _____</p> <p>IgG suero: _____</p>

**Apéndice N°3. Protocolo de Extracción de ADN de muestras de sangre
(QUIAGEN cat N° 158908)**

1. Descongelar las muestras a 4 °C por la noche y al momento de trabajar ponerlas en hielo en un termo.
2. Agregue 900µL del buffer “RBC Cell Lysis Solution” a un vial de 2 ml
3. Agregue 600µL de sangre al vial de 2ml y homogenice con la pipeta
4. Incube por 1 minuto a temperatura ambiente, agitando los tubos por inversión.
5. Centrifugue a 1000 rpm por 20 segundos
6. Descarte el sobrenadante utilizando una pipeta
7. Aplique vortex hasta homogenizar el pelet
8. Agregue 900µL del buffer “RBC Cell Lysis Solution” y homogenice con la pipeta
9. Incube por 1 minuto a temperatura ambiente, agitando los tubos por inversión.
10. Centrifugue a 1000 rpm por 20 segundos
11. Descarte el sobrenadante utilizando una pipeta
12. Aplique Vortex hasta homogenizar el pelet de células blancas
13. Agregar 600µL de “Cell Lysis Solution” a las células resuspendidas y agite con la pipeta o con vortex
14. Etiquetar los viales que contienen DNA genómico y conservar a temperatura ambiente.

Apéndice N°4. Genotipificación de CCR5Δ32 por q-PCR FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)

1. Descongelar los reactivos y colocar el ADN genómico en hielo.
2. Preparar el Master Mix

Componente	[Final] (nM)	Vol (μL)x Rxn
FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) 2X	1X	12.5
Forward Primer (10 μM)	400 nM	0.5
Reverse Primer (10 μM)	400 nM	0.5
Agua libre de nucleasas		10.5
ADN		1.0
Total		25 μl

3. Mezclar y centrifugar a 4000 rpm por 3 min.
4. Agregar 24 μL del Master Mix en cada pozo de la placa a utilizar.
5. Agregue 1 μL de ADN o Agua como NTC en cada pozo
6. Sellar los pocillos.
7. Colocar la placa en el equipo para PCR en Tiempo Real (ABI 7500)
8. Correr el siguiente programa:
 - Pre calentamiento a 95°C por 10 minutos
 - 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 49°C por 30 segundos y 72 por 1 minuto.