

Circulación de virus Chikungunya en el estado Aragua (Venezuela) durante el año 2014

Circulation of Chikungunya virus in Aragua state (Venezuela) during the year 2014

Daríá Camacho García^{1*}, Argelia Celis², Zoila Moros², Jesús Reyes Osorio¹, Ricardo Araujo¹, Andrea Alcántara¹, Víctor Picos Guerrero¹, Augusto Tarazón³, Ruth Blanco², Esmeralda Vizzi², Ferdinando Liprandi², Ana I. Negrodo A.³, María P. Sánchez-Seco³ & Guillermo Comach Pérez¹

RESUMEN

El virus chikungunya (CHIKV) es un Alfavirus causante de la fiebre chikungunya (CHIKF). En Venezuela, una región desprovista de inmunidad contra CHIKV y con presencia de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, el primer caso importado fue reportado por las autoridades sanitarias en junio de 2014. Por la relevancia del hecho, se analizaron 94 muestras de pacientes febriles que acudieron a los centros de salud públicos y privados del estado Aragua entre enero y diciembre de 2014, mediante la detección de los fragmentos de los genes nsP4 (*Alfavirus*) y E1 (CHIKV) utilizando técnicas moleculares, como Transcripción Reversa acoplada a Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) y/o secuenciación nucleotídica. Los resultados indicaron positividad en 19,2 % de las muestras analizadas. Se vieron afectados pacientes con edades entre 6 y 66 años, con predominio del sexo femenino (12/18). Clínicamente, todos los pacientes positivos a CHIKV manifestaron signos y síntomas asociados a CHIKF, tales como fiebre (18/18), artralgia (18/18) y erupción (16/18), entre otros. A pesar de que la positividad puede considerarse baja con relación a lo reportado en otras comunidades, este estudio representa el primer reporte local de detección molecular de CHIKV en Venezuela (estado Aragua) durante el año 2014.

Palabras clave: *Alfavirus*, chikungunya, Fiebre por chikungunya, RT-PCR, secuenciación nucleotídica.

SUMMARY

Chikungunya virus is an Alphavirus that causes chikungunya Fever (CHIKF). In Venezuela, a region devoid of immunity against CHIKV and presence of Aedes aegypti and Aedes albopictus. The first imported case was reported by health authorities in June 2014. The relevance of the fact, 94 samples of febrile patients who came to the centers of public and private health Aragua state between January and December for detection of the nsP4 (Alfavirus) and E1 (CHIKV) fragments were analyzed by molecular techniques (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction and/or nucleotide sequencing). The results showed 19.2 % of positivity by CHIKV. Clinically all CHIKV positive patients showed signs and symptoms related with CHIKF, such as fever (18/18), arthralgia (18/18) and rash (16/18), among others. Were affected patients between the ages of 6 and 66 years with a predominance of the female sex (12/18). Although the positivity may be considered low compared to those reported in other communities, this represents the first local report of molecular detection of CHIKV in Venezuela (Aragua state) during 2014.

Key words: *Alfavirus, chikungunya, chikungunya fever, RT-PCR, nucleotide sequencing.*

INTRODUCCIÓN

El virus Chikungunya (CHIKV) es un patógeno clasificado taxonómicamente dentro de la familia *Togaviridae*, género *Alfavirus* (Strauss y Strauss, 1986). Se transmite a humanos por la picadura de la hembra hematófaga del vector *Aedes aegypti* o

Aedes albopictus (Diallo *et al.*, 1999; OPS, 2011). La infección por este virus causa la fiebre Chikungunya (CHIKF), una enfermedad que muestra un amplio espectro de manifestaciones clínicas. Entre las más comunes, se encuentran fiebre, erupción cutánea y poliartalgia; esta última puede ser de larga duración, afectando extremidades (tobillos, muñecas, falanges)

¹ Laboratorio Regional de Diagnóstico e Investigación del Dengue y otras Enfermedades Virales. Instituto de Investigaciones Biomédicas "Dr. Francisco Triana Alonso". Universidad de Carabobo. Estado Aragua, Venezuela.

² Laboratorio de Biología de Virus. Centro de Microbiología y Biología Celular. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Estado Miranda, Venezuela.

³ Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. España.

*Autor de correspondencia: darycamacho@gmail.com

y grandes articulaciones (Robinson, 1955; Lam *et al.*, 2001; Hochedez *et al.*, 2006). Es una enfermedad raramente fatal, aunque en zonas como India y la isla de Mauricio se reportó elevación en las tasas de mortalidad durante las epidemias ocurridas durante los años 2004–2008 (Beesoon *et al.*, 2006; Mavalankar *et al.*, 2008). En las Américas, la información reportada en relación a los casos fatales hasta la semana epidemiológica 52 del año 2014, indicó que en países del Caribe latino y no latino, el total de fallecidos fue de 164 y 169; respectivamente. En los países del área andina, solamente Colombia reportó un total de tres fallecidos, mientras que Venezuela no registró ningún deceso (PAHO, 2014). Sin embargo, Torres *et al.* (2015) reportaron el fallecimiento de un paciente y sugirieron la posibilidad de ocurrencia de 20 casos letales adicionales durante el año 2014. La morbilidad es elevada, y se asocia principalmente a las artralgias que pueden generar incapacidad, así como disminución de la productividad con las subsecuentes pérdidas económicas (Soumahoro *et al.*, 2011). Cuando el CHIKV inicia su circulación en una población desprovista de inmunidad, se produce una elevada cantidad de casos, favoreciendo la aparición de grandes epidemias (Pialoux *et al.*, 2007). El CHIKV se ha propagado por Asia, África y Europa y en 2013 se introdujo en las Américas, inicialmente en la isla de San Martín (OPS, 2014; Van Bortel *et al.*, 2014). En Venezuela, el primer caso importado de CHIKV fue reportado por el Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS) en junio de 2014; y en julio de ese mismo año se registraron los dos primeros casos autóctonos del país, específicamente en el estado Aragua (MPPS, 2014). En esta entidad, desde el año 1995 y como parte del sistema de vigilancia epidemiológica funciona el Laboratorio Regional de Diagnóstico e Investigación del Dengue y otras Enfermedades Virales (LARDIDEV), el mismo recibe muestras de pacientes con sospecha clínica de padecer infección por el virus dengue (DENV). Sin embargo, debido a la situación de alarma epidemiológica generada por el reporte ministerial, se consideró la realización del análisis de muestras con resultado negativo a DENV (Lanciotti *et al.*, 1992), que ingresaron al laboratorio antes y después del mencionado reporte. Para el análisis se utilizaron metodologías de RT-PCR y secuenciación nucleotídica para la detección de *Alfavirus* (Sánchez-Seco *et al.*, 2011) y CHIKV (Dash *et al.*, 2008; Collao *et al.*, 2010). Este análisis permitió además de identificar al CHIKV, como agente etiológico de

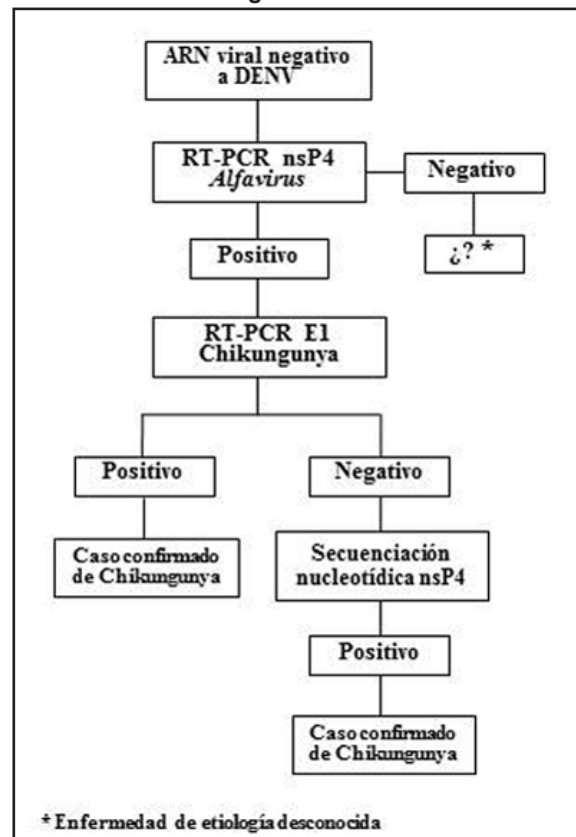
enfermedad en el estado Aragua, la confirmación del inicio del brote epidémico asociado al CHIKV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del Estudio

Se realizó un estudio retrospectivo, donde se analizaron 224 muestras de suero obtenidas de pacientes con sospecha clínica de padecer infección por DENV y/o CHIKV que acudieron entre enero y diciembre del año 2014 a centros de salud (públicos o privados) que conforman el sistema de vigilancia epidemiológica del estado Aragua. Estas muestras fueron inicialmente evaluadas mediante técnicas diagnósticas para detección de DENV (Lanciotti *et al.*, 1992). Todas aquellas que resultaron negativas a DENV (n: 94) fueron seleccionadas para análisis mediante técnicas moleculares para determinación de CHIKV. El algoritmo que se utilizó para el análisis molecular de las muestras se observa en la Fig. 1.

Fig. 1. Algoritmo establecido en este reporte para la confirmación de infección por CHIKV a partir de muestras de ARN negativas a DENV.



Obtención de ARN viral

A partir de 140 μ L de los sueros se obtuvieron los ARN virales mediante el uso del kit comercial FavorPrep® (FAVORGEN Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Amplificación de fragmentos genómicos correspondientes a especies del género *Alfavirus*

Se amplificó un fragmento de 195 pb correspondiente al gen nsP4 de miembros del género *Alfavirus* mediante una RT-PCR descrita previamente por Sánchez-Seco *et al.* (2011) con algunas modificaciones (Reyes *et al.*, 2016).

Amplificación del fragmento genómico *E1* correspondiente a CHIKV

Se utilizaron dos metodologías para la detección de CHIKV (Dash *et al.*, 2008; Collao *et al.*, 2010). Estas permitieron la amplificación de un producto de 205 pb (Dash *et al.*, 2008) y 469 pb (Collao *et al.*, 2010) correspondientes al gen de la glicoproteína de envoltura (E1) de CHIKV.

Electroforesis en geles de Agarosa al 2%

Los productos obtenidos a partir de las RT-PCR's fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y visualizados mediante tinción con bromuro de etidio y luz UV.

Secuenciación nucleotídica del gen nsP4

Los productos purificados de la segunda reacción de la amplificación (gen nsP4) (Sánchez-Seco *et al.*, 2011) de las muestras que resultaron positivas a este fragmento genómico, pero negativas a E1 por cualquiera de las dos técnicas fueron sometidas a un proceso de secuenciación automática. Los productos fueron analizados en el servicio de secuenciación y análisis de ácidos nucleicos de la Unidad de Estudios Genéticos y Forenses (UEGF) del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). El análisis de las secuencias nucleotídicas fue realizado haciendo uso del sistema Applied Biosystems de terminadores fluorescentes Big Dye™ y el instrumento de electroforesis multicapilar ABI 3130xl utilizado en la UEGF.

Identificación de las secuencias nucleotídicas

Se realizó mediante el uso de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Zhang *et al.*, 2000).

RESULTADOS

De las 94 muestras evaluadas, 18 (19,2%) resultaron positivas al género *Alfavirus*, hecho evidenciado por la presencia de bandas acordes al tamaño esperado para el fragmento del gen nsP4 amplificado (195 pb) (Fig. 2). Las muestras con resultado positivo para *Alfavirus*, fueron posteriormente analizadas mediante dos metodologías para la detección del gen E1 de CHIKV (Dash *et al.*, 2008; Collao *et al.*, 2010). La estrategia de análisis mediante estas metodologías permitió establecer una positividad de 13/94 (13,8%) específica para CHIKV (Fig. 3A y 3B). Los fragmentos del gen nsP4 de *Alfavirus* de las cinco muestras que permanecieron negativas a las RT-PCR's para E1, fueron analizados mediante secuenciación nucleotídica para su respectiva identificación etiológica. Los resultados indicaron que los fragmentos nucleotídicos analizados correspondían al CHIKV, alcanzando así un total de 18 pacientes positivos identificados como CHIKV, independientemente de la técnica utilizada para su análisis. Los resultados de la secuenciación nucleotídica, además de la identificación viral sugirieron la posible relación genómica de estas cepas con virus circulantes en países de la región de las Américas (Brasil y Puerto Rico), Asia (Tailandia y China), así como del continente africano (Comoros y Angola).

Fig. 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación a partir de ARN de pacientes febriles mediante RT-PCR de un fragmento de 195 pb correspondientes al gen nsP4 de *Alfavirus*. 1. LAR14-800, 2. LAR14-807, 3. LAR14-811, 4. LAR14-831, 5. LAR14-836, 6. LAR14-879, 7. Control negativo, 8. Control positivo: CHIKV, genotipo ECSA, cepa DRC 1721, M. Marcador (100 pb DNA step ladder, Axygen).

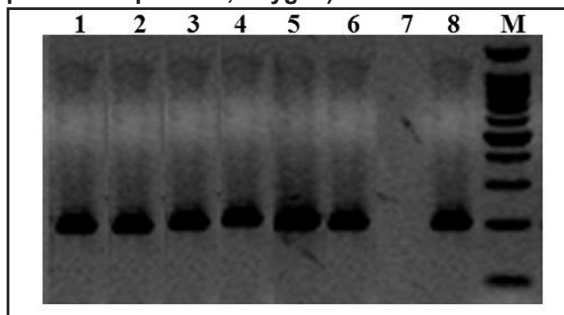
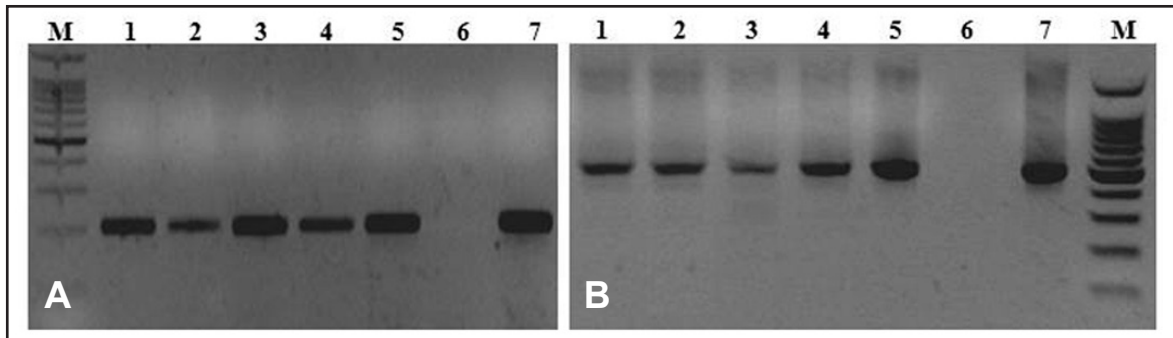


Fig. 3. A) Productos amplificados correspondientes a un fragmento de 205 pb del gen de la glicoproteína E1 del genoma de CHIKV obtenidos mediante la RT-PCR descrita por Dash *et al.* (2008). M. Marcador (100 pb *DNA step ladder*, Axygen). 1. LAR14-800, 2. LAR14-807, 3. LAR14-811, 4. LAR14-831, 5. LAR14-898, 6. Control negativo, 7. Control positivo: genotipo ECSA, cepa DRC 1721. B) Productos amplificados correspondientes a un fragmento de 469 pb del gen de la glicoproteína E1 del genoma de CHIKV obtenidos mediante la RT-PCR descrita por Collao *et al.* (2010). 1. LAR14-800, 2. LAR14-807, 3. LAR14-811, 4. LAR14-836, 5. LAR14-879, 6. Control negativo, 7. Control positivo: genotipo ECSA, cepa DRC 1721, M. Marcador (100 pb *DNA step ladder*, Axygen).

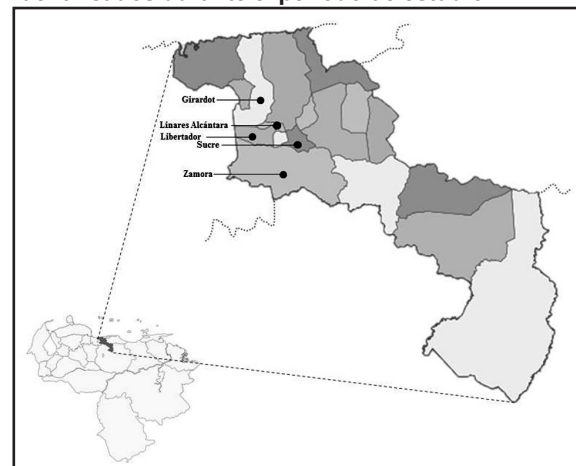
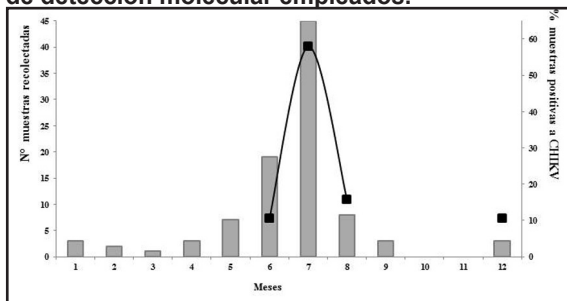


Los datos asociados a los meses de recolección de las muestras indicaron que los casos positivos para CHIKV se detectaron a partir del mes de junio (02/18), registrándose un mayor número de muestras positivas (11/18) durante el mes de julio de 2014 (Fig. 4). La distribución de los casos positivos mostró la mayor concentración en el municipio Girardot -área metropolitana de Maracay- (72,2 %) seguido por Libertador (11 %), Linares Alcántara (5,6 %), Sucre (5,6 %) y Zamora (5,6 %) (Fig. 5). Con relación a las variables edad y sexo, se observó que los pacientes positivos tenían edades comprendidas entre 6 y 66 años, con una mediana de 27 años. La distribución por grupo etario indicó que la mayoría de los casos positivos se agrupó en los pacientes con edades menores a 15 años (38,9 %), seguido por los grupos etarios entre 46 y 60 años (27,8 %) y 16 a 30 años (22,2 %). Los grupos etarios con menor número de casos correspondieron a aquellos con edades

entre 31 y 45 años (5,5 %) y mayores de 60 años (5,5 %). En el caso de la variable sexo, los pacientes positivos para CHIKV -bien fuese por RT-PCR o mediante secuenciación nucleotídica del fragmento nsP4 de *Alfavirus*- correspondieron en su mayoría a pacientes de género femenino (12/18). Clínicamente, todos los pacientes manifestaron signos y síntomas asociados a enfermedad por CHIKV, tales como fiebre (18/18), artralgia (18/18) y erupción (16/18). Otras manifestaciones clínicas presentes en algunos de los pacientes fueron cefalea, dolor ocular, mialgias y dolor abdominal.

Fig. 5. Distribución geográfica de los casos positivos a CHIKV en diferentes municipios del estado Aragua durante el año 2014. La positividad por municipio fue de 72,2% (Girardot), 5,6% (Linares Alcántara), 11% (Libertador), 5,6% (Sucre) y 5,6% (Zamora) tomando como base los 18 casos positivos identificados durante el período de estudio.

Fig. 4. Distribución del número de muestras recolectadas durante los meses del año 2014 en relación al número de muestras con diagnóstico positivo a CHIKV por cualquiera de los métodos de detección molecular empleados.



DISCUSIÓN

Los resultados mostrados permitieron generar el primer reporte local de detección molecular de circulación de CHIKV en el estado Aragua (Venezuela) durante el año 2014, así como la confirmación del tiempo de inicio del brote, tal como lo refirieron las autoridades de salud venezolanas (MPPS, 2014). Desde la introducción de CHIKV en las Américas, específicamente en las islas San Martín, Martinica, Guadalupe, San Bartolomé y Guyana Francesa (Van Bortel *et al.*, 2014), el resto de los países de la región de las Américas se situó en alerta epidemiológica, debido a que la zona presentaba las condiciones para la transmisión autóctona de CHIKV y el subsecuente establecimiento de la enfermedad. Entre estas condiciones, vale mencionar la ausencia de inmunidad para CHIKV (Panning *et al.*, 2009), la presencia en alta densidad de los mosquitos transmisores (*Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*) en países de la región, condiciones ambientales y de temperatura de las zonas tropicales y sub-tropicales -donde se incluye a Venezuela-, que favorecen el desarrollo y actividad de los vectores, así como la replicación viral en los mismos (Bhatt *et al.*, 2009; Gibney *et al.*, 2011). A pesar del alerta generado, y de los esfuerzos que pudieron haber hecho las autoridades sanitarias locales de los países con condiciones favorables para la introducción del CHIKV, este virus logró su rápida diseminación en países del Caribe y países del Norte, Centro y Sur de América, lo que aumentaba el riesgo de importación de CHIKV en nuevas áreas por parte de viajeros infectados (Staples *et al.*, 2009). De esta situación no escapó Venezuela, cuando en junio de 2014 las autoridades de salud informaron acerca de un caso importado de CHIKF procedente de República Dominicana, lo que favoreció la diseminación de la enfermedad y el establecimiento de casos autóctonos en el territorio venezolano (MPPS, 2014).

Esta situación epidemiológica, era de esperarse considerando las condiciones favorables para la transmisión de CHIKV (Bhatt *et al.*, 2009; Panning *et al.*, 2009; Gibney *et al.*, 2011), presentes en el estado Aragua, una zona endémica para enfermedades como el dengue (Rico-Hesse, 1990; Barrera *et al.*, 2000; Espino *et al.*, 2010), cuyo agente causal es cualquiera de los serotipos del DENV. Ambos patógenos (CHIKV y DENV) son transmitidos por el mismo vector *Aedes* spp. y clínicamente muestran gran similitud, lo que indiscutiblemente

genera dificultad para el reconocimiento clínico de la enfermedad. De allí la necesidad de evaluar muestras colectadas durante el año 2014 en pacientes de una zona endémica para DENV (Rico-Hesse, 1990; Barrera *et al.*, 2000; Espino *et al.*, 2010), con reporte de introducción de CHIKV (MPPS, 2014), pero con diagnóstico clínico impreciso de padecer CHIKF y/o dengue. Con los resultados obtenidos se evidenció positividad para CHIKV en 19,2 % de las muestras analizadas. Este dato fue de especial interés, ya que reportes previos han registrado tasas de positividad que oscilan entre 38 y 63 % (OPS, 2014), y en países de las Américas como República Dominicana y Surinam se alcanzó una positividad de 41 y 68 %; respectivamente (Pimentel *et al.*, 2014; van Genderen *et al.*, 2015).

De acuerdo a estos antecedentes, y a la ocurrencia de casos positivos concentrados en municipios muy cercanos, se esperaba una rápida diseminación de la infección, y por ende una detección de CHIKV mucho más elevada en el estado Aragua. En función a este resultado, se plantearon algunas de las posibles causas que explican esta baja detección de CHIKV, lo que podría denominarse un subdiagnóstico circunstancial de casos. Entre estas se destaca la falta de preparación ante la contingencia que se avecinaba, producto de la dificultad de acceso a suficientes recursos para la puesta en marcha de metodologías diagnósticas pautadas por organismos internacionales (OMS, 2011). Esta deficiencia en los recursos, redundó en la imposibilidad de evaluación de una mayor cantidad de muestras, lo que no favoreció el diseño y ejecución oportuna de estudios prospectivos, que permitieran determinar tasas de incidencia con valores más cercanos a lo que probablemente ocurrió en el año 2014. De igual forma, vale destacar que las dolencias causadas por CHIKF, particularmente las asociadas a las afecciones en grandes articulaciones (Robinson, 1955; Lam *et al.*, 2001; Hochedez *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009) pudo haber limitado la movilidad de los pacientes en la búsqueda de atención médica, generando un subregistro de la morbilidad de la enfermedad. Sin embargo, es evidente que el número de casos de CHIKF pudo haber sido mayor, considerando además que en Venezuela -basado en el número de pacientes con enfermedad febril aguda atendidos en las consultas externas del Ministerio de Salud-, desde junio de 2014, estuvieron por encima de 1.900.000 casos (MPPS, 2014 citado en Torres *et al.*, 2015). Este registro y la limitada cantidad de muestras evaluadas en este estudio, indican la necesidad de

reforzar la vigilancia clínica y epidemiológica en el país, hecho que incluye un diagnóstico de laboratorio oportuno, sustentado en lineamientos internacionales (OMS, 2011).

En relación a las herramientas diagnósticas, la necesidad de utilizar diferentes metodologías de RT-PCR para la detección de CHIKV sugirió que las mismas presentaban limitaciones al no revelar la totalidad de los casos. Esta evidencia fue confirmada al someter las muestras de pacientes positivos para *Alfavirus*, negativos para CHIKV (Dash *et al.*, 2008; Collao *et al.*, 2010) a un proceso de secuenciación nucleotídica del fragmento nsP4, lo cual permitió demostrar que las mismas correspondían a CHIKV y no a otro *Alfavirus*, como se hubiese podido sospechar inicialmente, debido que en Venezuela se ha notificado la circulación de otros miembros de este género, como el virus de la Encefalitis Equina Venezolana y el virus Mayaro como causa de brotes en humanos (OPS, 2010). Las limitaciones a las que se hizo referencia previamente, incluye la obtención de un alto porcentaje [80,8% (76/94)] de sueros negativos a *Alfavirus*, lo que sugieren que las metodologías moleculares empleadas precisan mayor especificidad y sensibilidad, así como la necesidad de inclusión de metodologías que favorezcan el diagnóstico diferencial de patologías como; influenza, rubeola, malaria, leptospirosis u otros procesos infecciosos que son prevalentes en el país (MPPS, 2014) y que clínicamente pueden cursar con manifestaciones similares.

Un hallazgo de interés fue la posible relación genómica de las cepas de CHIKV aragueñas con virus circulantes en países de la región de las Américas y el Caribe (Brasil y Puerto Rico), Asia (Tailandia y China) y África (Comoros y Angola). Los estudios filogenéticos han determinado que las cepas de CHIKV circulantes en el Caribe y las Américas pertenecen al genotipo asiático (Lanciotti y Valadere, 2014; Leparc-Goffart *et al.*, 2014; Díaz *et al.*, 2015), mientras que el genotipo ECSA solo se ha reportado en Brasil (Nunes *et al.*, 2015). Este hallazgo en el país vecino, así como la identificación mediante secuenciación nucleotídica y la presencia del vector *Ae. albopictus* sugieren que el genotipo ECSA pudo circular en más países de las Américas, incluyendo a Venezuela. Sin embargo, para la identificación de el/los genotipo/s circulantes en 2014 en el estado Aragua, son necesarios análisis filogenéticos exhaustivos que

incluyan la secuenciación del genoma completo y/o de fragmentos genómicos como E1 y/o E2, a fin de establecer la posible circulación de ambos genotipos en el estado, los cuales podrían asociarse con los casos clínicos caracterizados por presentar manifestaciones atípicas y/o letalidad (Torres *et al.*, 2015). La posibilidad de circulación de ambos genotipos en el país (asiático y ECSA) no resultaría un evento raro debido –entre otras causas- a la cercanía geográfica entre Venezuela y Brasil.

En relación al análisis de los datos clínicos y epidemiológicos de los pacientes diagnosticados con infección por CHIKV, se observó predominio de pacientes del sexo femenino afectadas por CHIKV. Este hallazgo resultó consistente con otros reportes, donde se muestra una tendencia similar (Lam *et al.*, 2001; Renault *et al.*, 2007; Doke *et al.*, 2011; Nunes *et al.*, 2015; Farah *et al.*, 2016). La preponderancia de este resultado, podría relacionarse con el incremento de actividades peridomésticas, lo que redundaría en diferentes niveles de exposición al vector transmisor (Ooi *et al.*, 2006); así como el uso de vestimenta que permite mayor exposición de piel favoreciendo las picaduras de los mosquitos, hecho que ocurre en países tropicales como Venezuela debido a las características climatológicas del país. En cuanto a la edad, a pesar del escaso número de pacientes evaluados se observó la afectación de personas en un amplio rango de edades (6-66 años). El predominio de infecciones en menores de 15 años de edad, sugirió un comportamiento epidemiológico de la enfermedad, similar a lo descrito para DENV. Este hecho se sustenta en una mayor exposición de este grupo etario, a los vectores transmisores de DENV (Arboleda *et al.*, 2001; Rigau-Pérez *et al.*, 2001) y en consecuencia de CHIKV. Con relación a la presentación clínica, la mayoría de los pacientes que resultaron positivos para CHIKV mostraron sintomatología descrita para la infección causada por este agente infeccioso, entre las que se encuentran fiebre, cefalea, mialgia, artralgia, entre otros (Robinson, 1955; Lam *et al.*, 2001; Hochedez *et al.*, 2006; OPS, 2014), pero que podría generar confusión en el momento de establecer un diagnóstico diferencial, basándose solo en hallazgos clínicos. Es importante mencionar, que tres de los pacientes positivos para CHIKV reportaron hospitalización y aunque no fue posible la obtención de otros datos que indicaran atipia en la presentación clínica, no es de descartar que los casos mostraran alguna complicación clínica, como ha sido reportado en otros pacientes (Torres *et al.*, 2015).

Los datos mostrados en este reporte indican la emergencia del CHIKV como patógeno amenazante para nuestra comunidad, así como la posibilidad de circulación de cepas correspondientes a distintos genotipos. Asimismo, la imperiosa necesidad de fijar estrategias contundentes que limiten la circulación de este y otros *Alfavirus*, así como de cualquier otro virus transmitido por vectores competentes (e.g.: *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*). Estos resultados exigen de las autoridades de salud la ampliación del diagnóstico virológico, así como el diseño de metodologías para discriminar oportunamente la infección causada por CHIKV de otras infecciones virales.

Conflictos de intereses

Los autores manifestamos que no ha habido conflictos de intereses en la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Leticia Franco del Instituto Carlos III (España) por la gentil donación del control de CHIKV (genotipo ECSA, cepa DRC 1721) a través del programa VIRORED-CYTED.

REFERENCIAS

Arboleda M., Campuzano M., Restrepo B. N. & Cartagena G. (2006). *Caracterización clínica de los casos de dengue hospitalizados en la E.S.E. Hospital "Antonio Roldán Betancur", Apartadó, Antioquia, Colombia, 2000*. Documento en Línea. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/843/84326212.pdf> [Consultado: 2016, Febrero, 23].

Barrera R., Delgado N., Jiménez M., Villalobos I. & Romero I. (2000). Estratificación de una ciudad hiperendémica en dengue hemorrágico. *Pan American Journal of Public Health*. **8**: 225-233.

Beesoon S., Funkhouser E., Kotea N., Spielman A. & Robich R. (2006). Chikungunya Fever, Mauritius, 2006. *Emerg. Infect. Dis.* **14**: 337-338.

Bhatt S., Gething P. W., Brady O.J., Messina J. P., Farlow A. W., Moyes C. L., et al. (2016). *The global distribution and burden of dengue*. Documento en Línea. Disponible en: <http://www.nature.com/>

[nature/journal/v496/n7446/pdf/nature12060.pdf](http://www.nature.com/nature/journal/v496/n7446/pdf/nature12060.pdf). [Consultado: 2016, Enero, 03].

Collao X., Negredo A. I., Cano J., Tenorio A., de Ory F., Benito A., et al. (2010). Different Lineages of Chikungunya Virus in Equatorial Guinea in 2002 and 2006. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **82**: 505-507.

Dash P. K., Parida M., Santhosh S. R., Saxena P., Srivastava A., Neeraja M., et al. (2008). Development and evaluation of a 1-step duplex reverse transcription polymerase chain reaction for differential diagnosis of Chikungunya and dengue infection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **62**: 52-57.

Diallo M., Thonnon J., Traore-Lamizana M. & Fontenille D. (1999). Vectors of Chikungunya virus in Senegal: Current data and transmission cycles. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**: 281-286.

Díaz Y., Carrera J. P., Cerezo L., Arauz D., Guerra I., Cisneros J., et al. (2015). Chikungunya virus infection: first detection of imported and autochthonous cases in Panama. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **92**: 482-485.

Doke P. P., Dakhure D. S. & Patil A.V. (2011). A clinico-epidemiological study of Chikungunya outbreak in Maharashtra State, India. *Indian J. Public Health*. **55**: 313-316. doi: 10.4103/0019-557X.92413 PMID: 22298142.

Espino E., Comach G., Sierra G., Guzmán D., Camacho D., Cabello-Quintana M. et al. (2010). *Incidencia de infecciones sintomáticas y asintomáticas por virus dengue en Maracay, Venezuela: 2006-2007*. Documento en Línea. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-46482010000100007&lng=es&tlng=es. [Consultado: 2017, Marzo, 10].

Farah T., van Genderen F. T., Krishnadath I., Sno R., Grunberg M. G., Zijlmans W., et al. (2016). First Chikungunya Outbreak in Suriname; Clinical and Epidemiological Features. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**: 2-18. doi: 10.1371/journal.pntd.0004625.

Gibney K. B., Fischer M., Prince H. E., Kramer L. D., St. George K., Kosoy O. L., et al. (2011). *Chikungunya fever in the United States: a fifteen year review of cases*. Documento en Línea.

- Disponible en: <http://academic.oup.com/cid/article/52/5/e121/386612/Chikungunya-Fever-in-the-United-States-A-Fifteen>. [Consultado: 2016, Enero, 03].
- Hochedez P., Jaureguiberry S., Debruyne M., Bossi P., Hausfater P., Brucker G., et al. (2006). Chikungunya infection in travelers. *Emerg. Infect. Dis.* **12**: 1565-1567.
- Lam S. K., Chua K. B., Hooi P. S., Rahimah M. A., Kumari S., Tharmaratnam M., et al. (2001). Chikungunya infection-an emerging disease in Malaysia. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* **32**: 447-451.
- Lanciotti R. S., Calisher C. H., Gubler D. J., Chang G. J. & Vorndam A. V. (1992). Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 545-551.
- Lanciotti R. S. & Valadere A. M. (2014). Transcontinental movement of Asian genotype Chikungunya virus [letter]. *Emerg. Infect. Dis.* **20**: 1400-1402.
- Leparc-Goffart I., Nougaiyre A., Cassadou S., Prat C. & de Lamballerie X. (2014). *Chikungunya in the Americas*. Documento en Línea. Disponible en: [http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(14\)60185-9/abstract](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(14)60185-9/abstract) [Consultado: 2016, Febrero, 23].
- Mavalankar D., Shastri P., Bandyopadhyay T., Parmar J. & Ramani K. V. (2008). Increased Mortality Rate Associated with Chikungunya Epidemic, Ahmedabad, India. *Emerg Infect Dis.* **14**: 412-415.
- MPPS (2014). Boletín epidemiológico, semana 44. Documento en Línea. Disponible en: http://www.bvs.gob.ve/boletin_epidemiologico/Boletin%2044%202013.pdf [Consultado: 2016, marzo, 11].
- MPPS. *Información oficial de los casos de Chikungunya en Venezuela*. Documento en Línea. Disponible en: http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com_content&view=article&id=6645&Itemid=18 [Consultado: 2016, Enero, 03].
- Nunes M. R., Faria N. R., de Vasconcelos J. M., Golding N., Kraemer M. U. & de Oliveira, L. F. (2015). Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Medicine*, **13**: 102.
- Ooi E. E., Goh K. T. & Gubler D. J. (2006). *Dengue prevention and 35 years of vector control in Singapore*. Documento en Línea. Disponible en: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/12/6/05-1210_article.htm [Consultado: 2015, Mayo, 20].
- OPS (2010). *Alerta epidemiológica: Brote de fiebre mayaro en las Américas*. Documento en Línea. Disponible en: http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2010/alertas_epi_2010_10_junio_fiebre_mayaro.pdf. [Consultado: 2017, Marzo, 11].
- OPS (2011). *Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus chikungunya en las Américas*. Documento en Línea. Disponible en: http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/CHIKV_Spanish.pdf [Consultado: 2016, Enero, 03].
- PAHO (2014). *Chikungunya: Datos, mapas y estadísticas de OPS/OMS*. Documento en Línea. Disponible en: 2014 http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=7926&Itemid=40931&lang=es. [Consultado: 2017, Marzo, 11].
- Panning M., Wichmann D., Grywna K., Annan A., Wijesinghe S., Kularatne S. A., et al. (2009). No evidence of Chikungunya virus and antibodies shortly before the outbreak on Sri Lanka. *Med. Microbiol. Immunol.* **198**: 103-106.
- Pialoux G., Gaüzère B., Jauréguiberry S. & Strobel M. (2007). Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *Lancet Infect. Dis.* **7**: 319-327.
- Pimentel R., Skewes-Ramm R. & Moya J. (2014). *Chikungunya in the Dominican Republic: lessons learned in the first six months*. Documento en Línea. Disponible en: http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1020-49892014001000008&lng=en&tlng=en. [Consultado: 2017, Marzo, 11].
- Renault P., Solet J. L., Sissoko D., Balleydier E., Larrieu S., Filleul L., et al. (2007). A major epidemic of Chikungunya virus infection on

- Reunion Island, France 2005–2006. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **77**: 727–31.
- Reyes J., Comach G., Franco L. & Camacho D. (2016). *Estandarización de técnicas para el diagnóstico molecular de flavivirus y alfavirus*. Documento en Línea. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-32932016000100005&lng=es&tlng=es. [Consultado: 2017, Marzo, 08].
- Rico-Hesse R. (1990). Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*. **174**: 479–493
- Rigau-Pérez J. G., Aayala-López A., Vorndam A. V. & Clark G. (2001). Dengue activity in Puerto Rico during an interepidemic period (1995-1997). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **64**: 75-83.
- Robinson M. (1955). An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953. *Trans. Royal Society Trop. Med. Hyg.* **49**: 28-32.
- Sánchez-Seco M. P., Rosario D., Quiroz E., Guzmán G. & Tenorio A. (2011). A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the alphavirus genus. *J Virol Methods*. **95**: 153–161.
- Sissoko D., Malvy D., Ezzedine K., Renault P., Moschetti F., Ledrans M., *et al.* (2009). *Post-Epidemic Chikungunya Disease on Reunion Island: Course of Rheumatic Manifestations and Associated Factors over a 15-Month Period*. Documento en Línea. Disponible en: <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000389> [Consultado: 2017, Marzo, 17].
- Soumahoro M. K., Boelle P. Y., Gaüzere B. A., Atsou K., Pelat C., Lambert B., *et al.* (2011). The Chikungunya Epidemic on La Réunion Island in 2005–2006: A Cost-of-Illness Study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5**: e1197.
- Staples E., Hills S. & Powers A. *Chikungunya*. En: *CDC Health Information for International Travel. Yellow Book Homepagel*. Oxford University Press. Documento en Línea. Disponible en: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2016/infectious-diseases-related-to-travel/Chikungunya>. [Consultado: 2015, Diciembre, 20].
- Strauss E. G. & Strauss J. H. (1986). *Structure and replication of the alphavirus genome*. En: Schlesinger S. & Schlesinger M. J., editors. *The Togaviridae and Flaviviridae*. New York: Plenum Press. New York, USA.
- Torres J. R., Leopoldo Códova G., Castro J S., Rodríguez L., Saravia V., Arvelaez J., *et al.* (2014). Chikungunya fever: Atypical and lethal cases in the Western hemisphere: A Venezuelan experience. *IDCases*. **2(1)**: 6-10. doi: 10.1016/j.idcr.2014.12.002.
- Van Bortel W., Dorleans F., Rosine J., Blateau A., Rousset D., Matheus S., *et al.* (2014). *Chikungunya outbreak in the Caribbean region, December 2013 to March 2014, and the significance for Europe*. Documento en Línea. Disponible en: <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V19N13/art20759.pdf>. [Consultado: 2016, Enero, 03].
- Van Genderen F. T., Krishnadath I., Sno R., Grunberg M. G., Zijlmans W. & Adhin M. R. (2016). First Chikungunya Outbreak in Suriname; Clinical and Epidemiological Features. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**: e0004625.
- Zhang Z., Schwartz S., Wagner L. & Miller W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* **7**: 203-214.

Recibido el 28/07/2016
Aceptado el 20/12/2016