



Usefulness of immunological and molecular methods for the diagnosis of Chikungunya virus

Utilidad de los métodos inmunológicos y moleculares para el diagnóstico del virus del Chikungunya

Írides Chaverra Mendoza¹, Anderson Ayala¹

¹Universidad Libre. Barranquilla, Colombia.

ABSTRACT

Background: Chikungunya is a virus that has caused many infectious outbreaks worldwide becoming a public health problem. It shares several similarities with the Dengue virus, are transmitted by the same vector that is a mosquito of the genus *Aedes*, are found in tropical and subtropical areas and present the same clinical symptoms in the acute phase of the disease, which makes its clinical diagnosis difficult.

Methods: Bibliographic revision of the diagnostic methods of the virus from the world literature in searchers of database and indexed journals.

Discussion: Among the results it can be said that of all the immunological techniques, the MAC ELISA formats for antibody detection and the ELISAs for antigen detection show reliable results for the identification of the virus, with respect to the molecular tests it can be affirmed that they are highly sensitive and specific techniques, with multiple advantages over immunological techniques since they can detect and quantify both viruses simultaneously.

Conclusion: The best techniques are molecular tests, but it is very expensive for most laboratories, therefore, the use of ELISA assays based on antigen detection is recommended because they are specific, sensitive and can detect the virus in the acute phase of the disease.

RESUMEN

Introducción: Chikungunya es un virus que ha ocasionado muchos brotes infecciosos a nivel mundial convirtiéndose en un problema de salud pública. Comparte varias similitudes con el virus del Dengue, son transmitidos por el mismo vector que es un mosquito del género *Aedes*, se encuentran en zonas tropicales y subtropicales y presentan la misma sintomatología clínica en la fase aguda de la enfermedad, lo que dificulta su diagnóstico clínico.

Métodos: Revisión bibliográfica de los métodos diagnósticos del virus a partir de la literatura mundial en buscadores de base de datos y revistas indexadas

Discusión: Entre los resultados se puede decir que de todas las técnicas inmunológicas los formatos de MAC ELISA para detección de anticuerpos y los ELISA para detección de antígenos muestran resultados confiables para la identificación del virus, con respecto a las pruebas moleculares se puede afirmar que son técnicas altamente sensibles y específicas, con múltiples ventajas sobre las técnicas inmunológicas ya que pueden detectar y cuantificar ambos virus en forma simultánea.

Conclusión: Las mejores técnicas son las pruebas moleculares, pero es muy costosa para la mayoría de los laboratorios, por tanto, se recomienda el uso de ensayos de ELISA basados en detección de antígenos debido a que son específicos, sensibles y pueden detectar al virus en la fase aguda de la enfermedad.

Keywords Chikungunya diagnosis; RT-PCR; MAC-ELISA

Palabras clave Chikungunya diagnóstico; RT-PCR; MAC-ELISA

Submitted 30 Oct 2017
Accepted 07 Nov 2017
Published 12 Dec 2017

Editor in chief
Isaac Kuzmar
editor@revcis.com

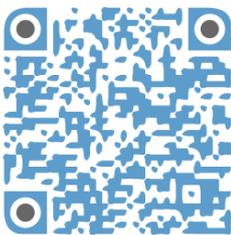
Academic editor
Henry González

Corresponding author
Írides Chaverra Mendoza,
irisch913@hotmail.com

DOI 10.17081/
innosa.4.2.2782

© Copyright 2017
Chaverra & Ayala¹.
Distributed under Creative
Commons
CC-BY 4.0

OPEN ACCESS



I.INTRODUCCIÓN

Chikungunya (CHIKV) o fiebre de Chikungunya como es llamada en algunas partes del mundo es una enfermedad causada por un virus de RNA perteneciente al género *Alfavirus* transmitida por un vector que para este virus es el mosquito del género *Aedes*, los más conocidos son *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. El primer aislamiento del virus fue en 1952 en Tanzania y a partir de allí ha causado innumerables brotes en muchas zonas tropicales y subtropicales, y aunque se creía que era una enfermedad solo del continente africano y asiático, el Chikungunya traspasó fronteras y su presencia es una realidad en América ([Lo Presti, Lai, Cella, Zehender, Ciccozzi, 2014](#) & [Loreto, Diaz, Garrido, 2014](#)).

La enfermedad se caracteriza por los síntomas de fiebre, dolor en las articulaciones, prurito, salpullidos, y hasta complicaciones neurológicas. En aquellas zonas donde circula el vector del virus del Dengue, puede también circular el virus del Chikungunya ya que comparten el mismo vector para la transmisión, así mismo en las fases agudas de ambas enfermedades la sintomatología de las mismas es muy similar, tanto así que algunos autores describen que es clínicamente indistinguible la una de la otra con excepción del Dengue (DEN) grave en el cual puede haber hemorragia, y si no se realiza un diagnóstico oportuno y confiable puede haber complicaciones en las personas infectadas, porque se puede estar ante una situación de Dengue grave no tratado a tiempo. ([Razmy, 2014](#); [Nkoghe, Kassa, Bisvigou, Caron, Grard, 2012](#); [Tattevin, 2012](#); [Pongsiri, Praianantathavorn, Theamboonlers, Payungporn, Poovorawan, 2012](#); [Bedoya, Murillo, Bolaños, Hurtado, Ramirez, et al, 2012](#); [Instituto Nacional de Salud, 2014](#); [Rodriguez, Lastre, Camargo, Fuentes, Bermejo, Nieto, 2015](#)).

Debido a que la sintomatología de ambos virus es parecida, existen en ocasiones errores en el diagnóstico del Chikungunya y viceversa, hay estudios que demuestran la necesidad de encontrar un método de identificación del virus que sea confiable, seguro, oportuno y rápido en especial en la fase aguda de la enfermedad. Entre los métodos conocidos para la detección se encuentran el aislamiento viral, que es una técnica que permite separar, cultivar e identificar el virus a partir de otras muestras, es un poco dispendiosa de realizar y se obtienen resultados tardíos, aunque es una de las pruebas más confiables. Otro método es la detección de anticuerpos por ELISA, el cual es relativamente económico, pero puede generar reacciones cruzadas. También, existen las pruebas moleculares como Reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (RT-PCR), que al igual que el aislamiento, es una técnica confiable pero relativamente costosa. ([Tattevin, 2012](#); [Pongsiri et al., 2012](#); [Bedoya et al., 2012](#); [Instituto Nacional de Salud, 2014](#)).

En Colombia la prueba para detectar el virus del Chikungunya solo se realiza en la ciudad de Bogotá en el Instituto Nacional de Salud (INS) los resultados están disponibles en quince días y solo se le realizan las pruebas a aquellas muestras que sean positivas por sospecha clínica y que los resultados de serología para Dengue sean negativos. De hecho, los casos confirmados por clínica son aquellos casos donde el paciente provenga de una zona endémica y presente fiebre, prurito y artralgias, pero como se dijo anteriormente, los signos y síntomas de la enfermedad son

similares y es necesaria su confirmación por pruebas de laboratorio por tanto no se puede descartar la opción de que muchos de los casos que son confirmados por clínica, realmente no correspondan a casos causados por el virus del Chikungunya (*INS, 2014*).

Debido a todo lo anterior el objetivo de esta revisión bibliográfica es describir los métodos diagnósticos moleculares e inmunológicos que permitan la detección oportuna, rápida y confiable del virus del Chikungunya y de esta forma encontrar una prueba que sea de utilidad para el laboratorio en especial, en aquellos en los cuales no cuentan con muchos recursos o equipos especializados para la identificación de este virus que representa un problema de salud pública a nivel mundial.

II. MÉTODOS

El Chikungunya es una enfermedad causada por un Alphavirus, transmitida por diferentes especies del género *Aedes*, se caracteriza por fiebre asociada con artralgia severa y erupciones en la piel ([Lo Presti et al., 2014](#) & [Loreto et al., 2014](#)), esta infección usualmente no es fatal, pero causa poliartralgia que puede durar varias semanas, meses o años, de hecho, también se han reportado complicaciones como síndromes neurológicos ([Razmy, 2014](#)).

En la práctica el cuadro clínico del Chikungunya y del Dengue es similar en sus formas clásicas, por tanto, puede ser confuso particularmente en áreas donde circulan ambos virus. Después de un periodo de incubación ambas enfermedades inician abruptamente con fiebre aguda, artralgias, mialgias, dolores de cabeza, leucopenia y linfopenia, erupciones y fatiga, de hecho, estos desórdenes clínicos y hematológicos son algo inespecíficos y no ayudan mucho para el diagnóstico diferencial por lo que se necesitan confirmación de prueba de laboratorio ([Nkoghe et al., 2012](#)).

En Colombia las condiciones para la circulación y transmisión del virus son óptimas ya que el país presenta los vectores del dengue, el *Aedes aegypti* y/o *Aedes albopictus*, distribuidos en las áreas urbanas de 845 municipios del país, (aproximadamente 24 millones de habitantes), siendo éstos los mismos vectores que utiliza el virus Chikungunya para hacer posible su transmisión ([Ministerio de Salud y Protección Social, Instituto Nacional de Salud, 2014](#)). Diariamente en las noticias de las revistas y medios colombianos se informa que hay más de 100 casos confirmados, por ejemplo, la revista semana en su edición digital de 03 de Enero de 2015, hablaba de 74.740 casos actuales y que podrían convertirse en 800.000 a mediados del 2015 ([De la Torre, 2015](#)). Sin embargo, al revisar los datos del Sistema vigilancia epidemiológica de Colombia (Sivigila) se puede observar que en el año 2014 se registraron 696 casos confirmados mientras que en las primeras doce semanas del año 2015 se registraron 469 casos. Al comparar la cantidad de eventos de dengue en el 2014 se puede evidenciar que fueron 42.861 y en estos primeros meses del presente año la cifra fue de 5.091 casos ([INS, 2014](#); [INS, 2015](#)).

Estos datos epidemiológicos pueden sugerir lo siguiente: que muchas personas infectadas no asisten al centro médico cuando tienen los síntomas, que las Instituciones prestadoras de salud (IPS) u hospitales no reportan a tiempo los casos al sistema de vigilancia epidemiológica, o que puede haber falsos diagnósticos del Chikungunya por parte del personal médico debido a que estos dos virus comparten muchas características tanto en su vía de transmisión, área endémica y ciertos aspectos de la sintomatología, lo que hace fácil confundirse algunas veces en el diagnóstico ([Tattevin P, 2012](#)).

Según un estudio realizado en Colombia hasta la primera semana del 2015 en Colombia se habían reportado 114.648 casos de Chikungunya y es uno de los países donde las pruebas específicas para la identificación del virus se realizan solo en la ciudad capital, por tanto, todas las muestras sospechosas deben ser enviadas a esa ciudad ([Bedoya, 2015](#)). Según los lineamientos de vigilancia del Chikungunya 2014 del INS, se utilizan tres principales pruebas de diagnóstico como

aislamiento viral, RT-PCR y serología las cuales son realizadas únicamente en la ciudad de Bogotá en el INS, cuyos resultados están disponibles en 15 días; estas pruebas solo se procesan a los casos sospechosos y con prueba de IgM para Dengue negativo, puesto que el diagnóstico a descartar es Dengue por la similitud de su cuadro clínico (INS, 2014).

Durante el año 2014 en Colombia se presentaron un total de 106.763 casos, mientras que en el año 2015 y hasta la semana epidemiológica número 52 se notificaron 359.728 casos, de los cuales 356.079 fueron confirmados por clínica, 3.202 confirmados por laboratorio y 447 casos sospechosos y según las unidades de análisis realizadas en el INS durante el 2015, se han confirmado 54 muertes por Chikungunya en todo el país (INS, 2015) (ver tabla 1). Para el INS los casos confirmados por laboratorio son aquellos casos sospechosos con resultados positivos en algunas de las pruebas específicas para CHIKV como aislamiento viral, RT-PCR, IgM o aumento de cuatro veces el título de anticuerpos IgG específicos para CHIKV en muestras pareadas con diferencias entre 15 días en la toma de éstas. Mientras que los casos confirmados por clínica son todo paciente con fiebre mayor de 38°C, pruritos, y artralgia grave que no se explique por otras condiciones médicas y que resida en un municipio donde se haya confirmado la circulación viral (INS, 2015), pero como se describió anteriormente según estudios los síntomas del CHIKV son clínicamente no diferenciables de los síntomas del Dengue y más si ambos virus circulan en la misma zona por lo que se hace necesaria una prueba que confirme el diagnóstico.

De acuerdo al informe brindado por la Organización Panamericana de la salud el número de casos reportados para Colombia en el año 2017 fue de 1052 casos sospechosos, de los cuales 28 fueron confirmados y 2 fallecidos (Organización Panamericana de la Salud, 2017).

Periodo	Casos confirmados por Clínica	Casos confirmados por Laboratorio	Casos sospechosos	Total
Semana 52-2015	547	0	8	555
Acumulado 2015	356.079	3.202	447	359.728
Acumulado 2014	104.405	1.456	902	106.763

Figura 1. Total de casos notificados de Chikungunya en Colombia a 2 de Enero 2016 (Fuente: Sivigila. Laboratorio de Virología. Instituto Nacional de Salud. Colombia)

Entre las pruebas inmunológicas se encuentran las que detectan anticuerpos, antígenos y técnicas de inmunofluorescencia. Entre las pruebas de detección de anticuerpos MAC ELISA ha demostrado ser el ensayo más preciso y confiable para el diagnóstico; en los estudios en los que la utilizaron demostró ser sensible y específica detectando los anticuerpos del virus inclusive en el día 4 de haber iniciado los síntomas, además con el transcurrir de los días aumenta su sensibilidad hasta en un 100%. Cabe resaltar que las pruebas de ELISA para captura de anticuerpos son de un costo accesibles y son muy fáciles de usar, pero tienen desventajas como reacciones cruzadas con otros Arbovirus, lo que representa falsos positivos y falsos negativos considerables. (Reddy, Ravi, Desai, Parida, Powers, et al., 2012)

Otra desventaja a considerar en las pruebas de ELISA para detección de anticuerpos incluyendo la técnica MAC ELISA es que no son muy confiables para el diagnóstico de la fase aguda, debido a que el organismo puede tardar varios días para la producción de anticuerpos contra el CHIKV; situación que es preocupante sobre todo en aquellas regiones donde existe co-circulación del virus del DEN y CHIKV ya que su sintomatología durante los primeros días puede ser clínicamente indistinguible ([Reddy, 2012](#))

Los formatos de ELISA basados en la detección de antígenos parece ser muy buena opción para el diagnóstico del CHIKV en fase aguda, ya que detectan proteínas del virus producidas desde el primer día del inicio de los síntomas, lo que la convierte en una prueba útil para el diagnóstico y tratamiento oportuno de la enfermedad, en los estudios que evaluaron estas técnicas mostraron que también eran sensibles específicas con un porcentaje mayor a 95% y costo efectivas. ([Kashyap, Morey, Chandak, Purohit, Taori, et al., 2010](#); [Yathi, Bhasker, Chinnamma, 2013](#))

Los test de detección rápida son los más económicos y es actualmente la primera opción de la mayoría de laboratorios de países subdesarrollados, pero se evidenció que no tiene buena especificidad y sensibilidad por la cantidad de falsos positivos y falsos negativos que presentan, por lo que la mayoría de los autores no recomiendan la utilización de este tipo de ensayos. El test de Inmunocromatografía basado en detección de antígenos mostró buenos resultados y concordancia en alto porcentaje con la prueba RT-PCR, por lo que podría considerarse este ensayo como una alternativa para los laboratorios que no cuentan con herramientas especializadas para la detección del virus. ([Prat, Flusin, Panella, Tenebray, Lanciotti, et al., 2014](#); [Okabayashi, Sasaki, Masrinoul, Chantawat, Yoksan, et al., 2015](#))

Las pruebas moleculares para la identificación del virus del CHIKV son una alternativa para un diagnóstico oportuno debido a que los resultados se generan de una forma rápida y precisa ya que no dependen de la producción de un anticuerpo específico si no que basta con la amplificación de fragmentos como proteínas de envoltura o proteínas no estructurales; entre la más utilizada se encuentra Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) ya sea en la modalidad RT-PCR Dúplex, RT-PCR en tiempo real y RT-PCR Dúplex.

Las pruebas moleculares son altamente confiables, sensibles y específicas en un 97%, de hecho, cuando se crean nuevas técnicas diagnósticas, éstas son comparadas y validadas solo con métodos moleculares. Las diferencias entre los tipos de RT-PCR que existen, varían en muchos aspectos como el tiempo de duración de las pruebas, cuantificación del ácido nucleico y la capacidad que tiene cada ensayo para detectar varios virus al mismo tiempo. ([Pongsiri et al., 2012](#); [Saha, Firdaus, Chakrabarti, Chandra, 2013](#); [Mishra, Sharma, Pujhari, Ratho, Gopal, et al., 2011](#))

De acuerdo a lo anterior, la limitación de una RT-PCR convencional es que, a pesar de tener una buena especificidad y sensibilidad, es el tiempo en que se demora el diagnóstico para diferenciar

los virus de DEN y CHIKV en una región donde circulen ambos, debido a que tendría que realizarse el procedimiento por separado, es decir dos técnicas convencionales por virus. Pero para las RT-PCR multiplex, esto no es un problema porque esta técnica tiene la facultad de poder realizar la reacción para la detección de ambos virus en un solo tubo, lo que simplificaría el tiempo del diagnóstico y por ende el tiempo del tratamiento. La prueba de RT-PCR en tiempo real es una técnica más completa y compleja que ofrece la opción de cuantificar el ARN viral, alta sensibilidad y especificidad e identificar y diferenciar los virus de Chikungunya y Dengue en un solo paso. ([Saha et al., 2013](#); [Mishra et al., 2011](#); [Cecilia, Kakade, Alagarasu, Patil, Salunke et al., 2015](#))

Como desventaja de las pruebas moleculares se puede mencionar que su sensibilidad se disminuye en las fases tardías de la enfermedad, son de fácil contaminación y alto costo, así mismo no todo el personal de un laboratorio convencional puede realizar su procesamiento debido a que no están capacitados para este tipo de pruebas. ([Reddy et al., 2012](#))

III. DISCUSIÓN

Para la detección del virus se utiliza comúnmente los métodos inmunológicos, entre ellos MAC ELISA, que es la técnica que tiene más altas sensibilidad y especificidad entre las pruebas de ELISA para detección de IgM, pero su desventaja es que es poco útil en el diagnóstico de fase temprana, ya que en los primeros días no logra detectar la presencia del virus, porque en esta etapa, se desarrollan los antígenos y no los anticuerpos.

De acuerdo a los lineamientos de la Organización Panamericana de la Salud que están descritos en la guía de Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus de CHIKV en América, se recomienda usar MAC ELISA en paralelo a una técnica de IgG Elisa, ya que se puede obtener un buen resultado observando el aumento y disminución relativa de los niveles de anticuerpos en las muestras pareadas. IgG por si sola es menos específica para el virus que IgM, pero aparece en suero un poco más tarde y permanece detectable después que IgM deja de estar presente en el suero. ([Organización Panamericana de la Salud, 2012](#))

Las pruebas de detección rápida basadas en captura de anticuerpos también tienen limitaciones, no solo por no detectar la fase temprana, sino porque arroja muchos falsos positivos y negativos.

Los ELISA para detección de antígeno, son los llamados a ser una buena opción para el diagnóstico del virus debido a que ellos lo pueden detectar durante la fase aguda, lo que ayuda en un diagnóstico rápido además que también tienen una buena sensibilidad y especificidad, al igual que las pruebas rápidas de inmunocromatografía de detección de antígenos, cuya utilización serviría para aquellos laboratorios en que sus costos son limitados.

Los métodos moleculares serían la opción ideal para la identificación del virus, ya que dependiendo de la técnica tienen la opción de poder diferenciar de forma simultánea los virus del DEN y CHIKV,

además que también lo harían en un muy buen tiempo y en la fase aguda de paciente, pero son muy costosos, necesita de personal especializado y no todos los laboratorios cuentan con recursos para la utilización de este tipo de métodos, hay que recordar que mayoría de lugares donde se inició un brote de CHIKV son países sub desarrollados y no todos los laboratorios cuentan equipamiento especial para la realización de los ensayos.

Otro aspecto importante a considerar es que debido a que la sintomatología de infecciones producidas por los virus de Dengue y Chikungunya es muy similar y en algunos casos tiende a confundirse, es vital poder realizar un análisis rápido, oportuno y confiable, como se mencionó anteriormente no es suficiente un diagnóstico basado en síntomas clínicos, por tanto, saber escoger el tipo de prueba a utilizar es fundamental. Las pruebas inmunológicas muestran resultados en tan poco tiempo por tanto sería lógico pensar que ellas serian una buena elección, pero hay que recordar que no son específicos en los estadios agudos, si no en la fase convaleciente y además en los lugares donde coexisten virus de la misma familia, pueden generar falsos positivos por las reacciones cruzadas o en su defecto falsos negativos lo que repercutiría en un mal tratamiento para el paciente.

Los ensayos moleculares también ofrecen la oportunidad de obtener reportes en pocas horas y dependiendo la prueba puede variar el tiempo de duración entre 120 minutos y 7 horas, los resultados son confiables, precisos, puede cuantificarse el virus y procesar al tiempo muestras sospechosas de Dengue y Chikungunya. Estas pruebas son más específicas en las fases agudas, lo que facilitaría diagnosticar más temprano el virus brindado al paciente un tratamiento más oportuno, así mismo una de las ventajas de estos métodos es que al mostrar resultados en tan corto tiempo con un alto grado de especificidad y sensibilidad, ayudaría a los laboratorios de salud pública a tener un diagnóstico rápido y por tanto implementar medidas de prevención oportunas contra el virus (Ver [Tabla 2](#)).

Características	Métodos Moleculares	Métodos Inmunológicos
Fundamento	Amplifica fragmentos de ácidos nucleicos	Detección de antígenos y anticuerpos,
Tiempo	1 hora a 7 horas	Minutos a 2 horas
Sensibilidad	Alta hasta en un 99%	Depende de la técnica
Especificidad	No reacciones cruzadas	Falsos positivos y negativos
Etapa de la detección	Fase aguda y fase tardía	Depende de la técnica

Figura 2. Características de los métodos moleculares e inmunológicos (Fuente: Elaboración del autor)

IV. CONCLUSIÓN

En esta revisión se considera que, para la detección del virus, las técnicas moleculares pueden ser un buen complemento con las técnicas inmunológicas, y dependiendo de la fase de la enfermedad que se encuentre el paciente puede ser más útil un método que el otro. Por ejemplo, si se busca detectar en fase temprana lo mejor sería utilizar un método molecular ya que en esta fase se encuentra la carga viral más alta, también con estos métodos se puede realizar un diagnóstico diferencial de otros virus lo cual es importante por ejemplo para tratar a tiempo un posible caso de Dengue grave o tomar medidas para prevenir las consecuencias más graves de Chikungunya. Así mismo, se menciona que estas técnicas son más específicas y sensibles; pero como la mayoría de los laboratorios no tienen la infraestructura o el personal capacitado para realizar este tipo de pruebas, se recomienda utilizar un método inmunológico de detección de antígenos que puede ser una buena opción para la identificación para esta fase.

Para las fases tardías es más recomendable utilizar las pruebas inmunológicas entre ellas MAC ELISA, ya que según los artículos citados en este estudio mencionan que en los estadios tardíos pueden alcanzar una sensibilidad y especificidad del 100%. No hay que dejar de lado que las técnicas de inmunofluorescencia han mostrado buena especificidad y que es capaz de detectar el virus aun así haya tenido variantes.

Lo ideal sería que los laboratorios nacionales o departamentales estandarizaran sus propias técnicas con los antígenos nativos del virus de cada región debido a que los virus pueden mutar y las técnicas existentes detectan la variante de la cepa para la cual fueron diseñadas, para esto se recomienda realizar más estudios aplicados en el país y así identificar si existen variantes génicas en las cepas circulantes en la región, para que de esta manera se pueda realizar una técnica que sea costo efectiva, sensible, específica y con resultados confiables para los laboratorios con recursos limitados.

Conflicto de intereses. Se declara que no existe ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS

- Bedoya Arias J, Murillo Garcia D, Bolaños Muñoz E, Hurtado Hurtado N, Ramirez Jaramillo V, et al. 2015.** Healthcare students and workers' knowledge about epidemiology and symptoms of chikungunya fever in two cities of Colombia. *J Infect Dev Ctries* 9(3): 330-332. DOI 10.3855/jidc.6445
- Cecilia D, Kakade M, Alagarasu K, Patil J, Salunke A, et al. 2015.** Development of a multiplex real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of dengue and chikungunya viruses. *Arch Virol* 160:323-327. DOI 10.1007/s00705-014-2217-x
- De la torre, J. 2015.** Habrá Chikungunya para rato. *Revista Semana*. Disponible en <http://www.semana.com/nacion/articulo/chikungunya->
- INS, 2014.** Lineamientos de vigilancia en salud pública, entomológica y de laboratorio ante la introducción del virus Chikungunya. Anexo 3 Lineamientos de vigilancia CHKV 2014:1-15. (Internet). (Último acceso 30 de Marzo 2015). Disponible en <http://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/Bibliot>
- INS. 2014.** Vigilancia rutinaria por eventos municipal. (Internet). (Último acceso 30 de Marzo 2015). Disponible en <http://www.ins.gov.co/lineasdeaccion/SubdireccionV>
- INS, 2015.** Actualización de lineamientos de la notificación de casos de virus Chikungunya en Colombia Fase II. Circular externa 0001.(Internet) (Último acceso 27 de abril 2015) Disponible en <http://www.ins.gov.co/Noticias/Chikungunya/Circula>
- INS. 2015.** Vigilancia rutinaria por eventos municipal.(Internet). (Último acceso 30 de Marzo 2015). Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccio>
- INS, 2016.** Semana epidemiológica número 52 de 2015. Boletín Epidemiológico semanal. 27 dic. Al 02 enero 2016: 26-30.(Internet). Disponible en: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Bolet>
- Kashyap R, Morey S, Chandak N, Purohit H, Taori G, et al. 2010** Detection of viral antigen, IgM and IgG antibodies in cerebrospinal fluid of Chikungunya patients with neurological complications. *Cerebrospinal Fluid Research*. (Último acceso 13 mayo 2015). DOI 10.1186/1743-8454-7-12
- Lo Presti A, Lai A, Cella E, Zehender G, Ciccozzi M. 2014.** Chikungunya virus, epidemiology, clinics and phylogenesis: A review. *Asian Pac J Trop Med* 7(12): 925-932. DOI 10.1016/S1995-7645(14)60164-4
- Loreto Horcada M, Diaz caldero C, Garrido L. 2014.** Fiebre chikungunya. Manifestaciones reumáticas de una infección emergente en Europa. *Reumatol Clin* 11(3): 161-164. <http://www.reumatologiaclinica.org/es/fiebre-chiku>
- Ministerio de Salud y Protección Social, Instituto Nacional de Salud. 2014..** Plan de Respuesta a la Fiebre por el Virus Chikungunya. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/Biblio>
- Mishra B, Sharma M, Pujhari S, Ratho R, Gopal D, et al. 2011.** Utility of multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction for diagnosis and serotypic characterization of dengue and Chikungunya viruses in clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 71:118–125. DOI 10.1016/j.diagmicrobio.2011.06.020

- Nkoghe D, Kassa R, Bisvigou U, Caron M, Grard G. 2012.** No clinical or biological difference between Chikungunya and Dengue Fever during the 2010 Gabonese outbreak. *Infect Dis Rep* 4(5):11-13.
[DOI 10.4081/idr.2012.e5](https://doi.org/10.4081/idr.2012.e5)
- Okabayashi T, Sasaki T, Masrinoul P, Chantawat N, Yoksan S, et al. 2015.** Detection of Chikungunya Virus Antigen by a Novel Rapid Immunochromatographic. *J Clin Microbiol* 53(2): 382-388.
[DOI 10.1128/JCM.02033-14](https://doi.org/10.1128/JCM.02033-14)
- Organización Panamericana de la Salud. 2012.** Nueva guía de preparación y respuesta ante eventual introducción del virus chikungunya.
http://www.paho.org/uru/index.php?option=com_contenido
- Organización Panamericana de la Salud. 2017.** Numero de los casos reportados de fiebre chikungunya en las Americas- SE 51. (Internet) (Último acceso 24 de Enero 2018) Disponible en
http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman
- Pongsiri P, Praianantathavorn K, Theamboonlers A, Payungporn S, Poovorawan Y. 2012.** Multiplex real-time RT-PCR for detecting Chikungunya virus and Dengue virus. *Asian Pac J Trop Med* 5(5): 342-346.
[DOI 10.1016/S1995-7645\(12\)60055-8](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60055-8)
- Prat CM, Flusin O, Panella A, Tenebray B, Lanciotti R, Leparç-Goffart I. 2014.** Evaluation of Commercially Available Serologic Diagnostic Tests for Chikungunya Virus. *Emerg Infect Dis* 20(12): 2129-2132.
[DOI 10.3201/eid2012.141269](https://doi.org/10.3201/eid2012.141269)
- Razmy A. 2014.** Clinical features of chikungunya infection in Sri Lanka. *Asian Pac J Trop Dis* 4(2):131-134.
[DOI 10.1016/S2222-1808\(14\)60329-7](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60329-7)
- Reddy V, Ravi V, Desai A, Parida M, Powers A, et al. 2012.** Utility of IgM ELISA, TaqMan Real-Time PCR, Reverse Transcription PCR, and RT-LAMP Assay for the Diagnosis of Chikungunya Fever. *J. Med. Virol.* 84: 1771-1778.
[DOI 10.1002/jmv.23406](https://doi.org/10.1002/jmv.23406)
- Rodriguez J, Lastre G, Camargo J, Fuentes G, Bermejo J, Nieto V.** Adherencia de los pacientes a la Guía de Práctica Clínica del Dengue (GPC_Dengue) en una Clínica de Barranquilla (Atl, Col). *Cienc. innov. salud.* 2015; 3(2):23-30.
[DOI 10.17081/innosa.3.2.92](https://doi.org/10.17081/innosa.3.2.92)
- Saha K, Firdaus R, Chakrabarti S, Chandra Sadhukhan P. 2013.** Development of rapid, sensitive one-tube duplex RT-PCR assay for specific and differential diagnosis of Chikungunya and dengue. *J Virol Methods* 193:521-524.
[DOI 10.1128/JCM.02033-14](https://doi.org/10.1128/JCM.02033-14)
- Yathi K, Bhasker S, Chinnamma M. 2013.** Determination of B cell epitopes and evaluation of antigen capture ELISA for the earlier diagnosis of CHIK virus using anti-rCHIK E1 rabbit antibodies. *J Immunol Methods* 393: 45-52.
[DOI 10.1016/j.jim.2013.04.005](https://doi.org/10.1016/j.jim.2013.04.005)